UNIVERSITÉ DE STRASBOURG — FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1936-1937 — N° 170

LE POUVOIR CHOLESTÉROLYTIQUE

ET SES RAPPORTS AVEC CERTAINS CONSTITUANTS DU SANG

THÈSE

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(Mention Pharmacie)

Présentée et soutenue publiquement le *1937*

à la

Faculté de Pharmacie de Strasbourg

par

P. PESQUIER

Pharmacien Lieutenant

Examinateurs de la Thèse { MM. A. SARTORY, *Professeur, Président*
P. CORDIER, *Chargé de Cours* } Juges
R. SARTORY, *Chargé de Cours* }

BESANÇON

IMPRIMERIE JACQUES ET DEMONTROND

1937

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. A. SARTORY, *Doyen*, C. ❋, I. ✪, C. ⚕
VOLMAR, *Assesseur.*
CUVIER, *Secrétaire*, A. ✪.

DOYEN HONORAIRE

M. JADIN, O. ❋, I. ✪, ⚕

PROFESSEURS

MM.	A. SARTORY, C. ❋, I. ✪, C. ⚕ ...	Bactériologie
	LAVIALLE, I. ✪, ⚕	Botanique
	VOLMAR, I. ✪	Chimie organique
	GUILLAUME, ❋, ⚕, I. ✪, ⚕	Pharmacie galénique
	LAPP, I. ✪	Chimie analytique
	CORDIER (Chargé du cours), ✪.....	Pharmacie chimique
	R. SARTORY (chargé du cours), ✪ .	Matière médicale

PROFESSEUR HONORAIRE

M. JADIN, O. ❋, I. ✪, ⚕.

CHARGÉ DES FONCTIONS D'AGRÉGÉ

M. R. SARTORY, ✪.

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.	A. SARTORY.....	Hygiène
	LAVIALLE.....	Hydrologie
	VOLMAR	Chimie minérale
	GUILLAUME.....	Zoologie
	LAPP	Physique
	EISENMANN.....	Législation et Déontologie
	CORDIER.....	Chimie biologique
	R. SARTORY	Cryptogamie
	DUQUENOIS	Toxicologie

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	R. SARTORY	Bactériologie et Parasitologie
	COLLARD, I. ✪, ⚕.....	Chimie pharmaceutique
	BOHN, A. ✪	Histoire naturelle
	DUQUENOIS	Chimie et Physique

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG — FACULTÉ DE PHARMACIE
Année 1936-1937 — N° 170

LE POUVOIR CHOLESTÉROLYTIQUE

ET SES RAPPORTS AVEC CERTAINS CONSTITUANTS DU SANG

THÈSE

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(Mention Pharmacie)

Présentée et soutenue publiquement le *1937*

à la

Faculté de Pharmacie de Strasbourg

par

P. PESQUIER
Pharmacien Lieutenant

Examinateurs de la Thèse { MM. A. SARTORY, *Professeur, Président*
P. CORDIER, *Chargé de Cours* } Juges
R. SARTORY, *Chargé de Cours* }

BESANÇON
IMPRIMERIE JACQUES ET DEMONTROND
—
1937

La Faculté n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A M. CORDIER,

chargé de Cours à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
qui, par son dévouement et ses judicieux conseils m'a permis de mener à bien ce travail.

Au médecin-général MORVAN,
Ancien Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire.

Au pharmacien-général MANCIER,
en signe de très respectueux hommage

Au médecin-général PHEULPIN

Au pharmacien-colonel MANCEAU
Professeur à l'Ecole d'Application du Val-de-Grâce,

Au pharmacien-colonel LEULIER,

Au pharmacien-lieutenant-colonel MANCEAU
Professeurs à l'Ecole de Santé et à la Faculté de Pharmacie de Lyon
avec mon respectueux souvenir.

Au médecin lieutenant-colonel CHARTON
avec l'hommage de toute ma gratitude

Au pharmacien-commandant LAURENT
qui a eu la bonté de me permettre de faire ce travail,

A MM. les médecins-militaires de l'Hôpital de Belfort,
à qui j'adresse tous mes remerciements pour l'aide qu'ils m'ont accordée.

Au pharmacien-commandant VELLUZ,
Professeur agrégé à l'Ecole d'Application du Val-de-Grâce
sous la haute direction de qui j'ai appris à travailler.

A la mémoire de mon parrain
Raphaël PESQUIER,
Disparu sur les Hauts de Meuse en septembre 1914

A MA FEMME
avec toute mon affection

A MES PARENTS ET BEAUX-PARENTS,

A TOUTE MA FAMILLE.

INTRODUCTION

Le rôle et la solubilisation du cholestérol dans l'organisme font encore l'objet de discussions nombreuses entre cliniciens et biologistes.

Récemment, M. Charonnat, dans plusieurs communications présentées à la Société de Pharmacie de Paris, a précisé certaines modalités concernant l'extraction du cholestérol du sang et indiqué que le méthylal permet de retirer la totalité de ce lipide.

Le sang humain, *in vivo*, se trouve plus ou moins saturé de cholestérol ; des phénomènes de non-saturation et de sur-saturation ont lieu, qui permettent, sous des influences minimes, la solubilisation ou la précipitation d'une certaine quantité de stérol. Ces phénomènes pourront se réaliser, *in vitro*, d'une manière analogue, si le sang est maintenu à l'étuve à 37°, au contact d'une certaine quantité de cholestérol, pendant un temps convenable. Loeper, puis Edgard Rosa, ont traduit ceci par une réaction quantitative, dénommée par Loeper le pouvoir cholestérolytique du sang ; cette réaction traduit la capacité du sang de dissoudre ou de précipiter du cholestérol.

Eck et Desbordes ont étudié ce pouvoir dissolvant en fonction des protéides du sérum ; les résultats qu'ils ont donnés nous ont amené à comparer les variations de celui-ci avec celles du rapport sérine-globuline, afin d'examiner l'influence de la composition en substances protéidiques du sang sur son pouvoir dissolvant vis-à-vis du cholestérol.

Les acides gras ont également leur rôle dans la solubilisation du cholestérol, ils fixent celui-ci sous forme d'esters, de composition diverse, plus facilement mis en suspension que le stérol libre. Sannié et Truhaut ont signalé un cas de précipitation spontanée du cholestérol dans un

sang d'ictérique et y ont noté un abaissement important du rapport entre le cholestérol estérifié et le cholestérol total. Ceci nous a amené à suivre les variations du rapport : cholestérol ester / cholestérol total, dans le sang, et à les comparer à celles du pouvoir cholestérolytique.

Sur les conseils de notre Maître, M. P. Cordier, chargé de Cours à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, nous nous sommes proposés d'étudier le mécanisme du pouvoir cholestérolytique du plasma sanguin et de rechercher de quels facteurs dépendait la solubilité du cholestérol dans le sang.

Pour obtenir des variations suffisamment importantes du pouvoir cholestérolytique, nous nous sommes adressé à des sujets pathologiques ; les cas examinés ont été les plus divers, de façon à donner plus de généralité au problème posé.

Notre étude s'est divisée en deux parties. Dans la première, nous avons dégagé de notre mieux les relations existant entre le cholestérol et les autres constituants du sang, d'après les ouvrages et les mémoires publiés jusqu'à ce jour.

Dans la deuxième partie, nous exposons nos méthodes de travail et les résultats que nous avons obtenus.

Nous pensons, par les conclusions que nous avons retirées de cette étude, avoir précisé quelques points concernant le mécanisme de cette réaction nouvelle sur laquelle est basée l'appréciation du pouvoir cholestérolytique, et avoir apporté une légère contribution dans cette question complexe de la solubilisation du cholestérol.

Avant d'entrer dans le détail de notre travail, nous tenons à adresser nos vifs remerciements à M. P. Cordier, chargé de Cours à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, qui a bien voulu nous inspirer le sujet de notre thèse et qui nous a guidé au cours de son exécution.

Nous tenons également à remercier M. le Professeur A. Sartory, Doyen de la Faculté, ainsi que M. R. Sartory, chargé de Cours, qui ont accepté de faire partie du jury de notre thèse ; nous les prions de croire à toute notre gratitude.

PREMIERE PARTIE

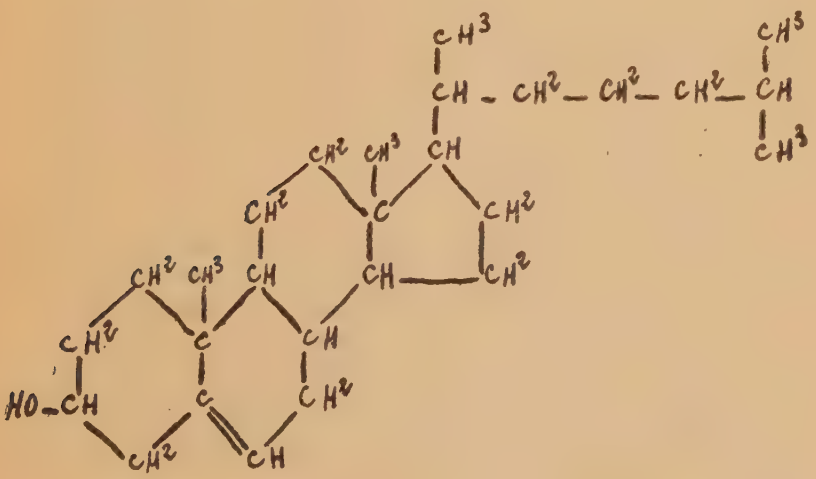
DONNÉES ACQUISES SUR LE CHOLESTÉROL LE POUVOIR CHOLESTÉROLYTIQUE ET LEURS RELATIONS AVEC LES AUTRES CONSTITUANTS DU SANG

CHAPITRE PREMIER

LE CHOLESTÉROL ET SES ETATS DANS LE SANG

Généralités

Les travaux de Windaùs ont montré que le cholestérol était un alcool secondaire non saturé, possédant une double liaison, chacune de ces fonctions portée sur un cycle fermé différent (mémoire de Cuny [34]). La formule développée, considérée aujourd'hui comme définitive, a été établie en 1932, 1933 et 1934, par Windaùs [150 a], Wieland [149 a], Rosenheim [182 b] et Lüttringhaùs [95 a] ; nous la citons ici d'après Stephan-Minovici [103] :



Le cholestérol (ancienne cholestérine), ou alcool cholestérique, ou mieux alcool cholestènique, se classe parmi les alcools cyclohexaniques.

Le cholestérol est insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool froid, très soluble dans l'alcool bouillant et dans l'éther ; cristallisé en paillettes très brillantes, il fond à +147° C. et se volatilise à + 350° C. Par saponification de ses esters, il donne des particules insolubles dans l'eau et les lessives alcalines, ce qui l'a fait ranger dans l'insaponifiable des graisses et du sang. Par sa fonction alcool, il donne des esters avec les acides, par exemple avec le troisième radical — OH de l'acide phosphorique non estérifié dans les acides phosphorés, comme la lécithine (Machebœuf [96]).

Dans l'organisme, le cholestérol a d'abord une origine exogène ; il est apporté par les aliments, tels que les œufs et les cervelles, riches en corps gras, ou par les phytostérols. Cette origine est d'ailleurs secondaire. L'origine principale est endogène ; les organes fabriquant du cholestérol dépendent du système réticulo-endothélial ; le foie, la rate (Abelous et Soula [1 a]), les glandes surrénales et ovariennes sont les organes producteurs ; Minovici [103] en 1934, montre que le foie synthétise le cholestérol à partir des oléides seulement, alors que la rate effectue cette synthèse à l'aide des acides gras, indépendamment des oléides ; cependant, d'après cet auteur, les oléides seraient la principale source de cholestérol.

La mise en réserve dans l'organisme n'existe pas à proprement parler ; Aschoff [7 a] prétendit longtemps que les organes du système réticulo-endothélial emmagasinaient le cholestérol ; Mayer et Schaffer [100 a] ont montré que le taux de cholestérol est remarquablement fixe dans chaque organe, et qu'il n'existe jamais d'enclave cellulaire constituée par lui. Le cholestérol en excédent des besoins normaux se répartit dans tout l'organisme, chez un sujet normal.

Les dépôts de cholestérol constituent donc des phéno-

mènes pathologiques. Ils se forment dans les lieux de moindre résistance ou de décharge, dans les régions vasculaires ou aux points de défense antitoxique (xanthomes, athéromes, substance caséeuse des tuberculeux). Ces dépôts sont favorisés par les tendances précipitantes ou floculantes de l'organisme (Leuret et Dutrenit [88]).

L'élimination du cholestérol se fait principalement par la bile ; tout ictère par rétention amène l'hypercholestérolémie (Gardner et Landner, cités par Leuret [88]). D'après Policard, cité par Leuret et Dutrenit [88], le cholestérol s'éliminerait dans la vésicule biliaire, en passant dans la bile directement sans aucune transformation ; les dépôts de cholestérol existant dans la vésicule corroborent ce fait. Le foie élimine également le cholestérol, mais en le transformant en oxycholestérol puis en acide cholalique (Schrader et Lénard, cités par Leuret [88]). La muqueuse intestinale élimine également du cholestérol, en le transformant en coprostérol. Le poumon a un pouvoir cholestérolytique puissant vis-à-vis du sang, le cholestérol passant du plasma aux globules (Bouisset, Bugnard et Soula, cités par Leuret [88]). Le corps thyroïde, par sa thyroxine, possède une action cholestérolytique vis-à-vis du sang, qui n'est pas à négliger, d'après Max et E. Lévy [90 a]. Enfin, si les tissus cutanés irradiés par la lumière solaire voient leur taux de cholestérol s'élever, la peau élimine d'assez grandes quantités de cholestérol par son sébum (Schmidt [132 a]) et Prueck [124 a]).

Le rôle du cholestérol dans l'organisme est très important quoique mal défini. Mayer et Schaffer [100 a] caractérisent un tissu par une constante cellulaire, appelée le coefficient lipocytique, qui est le rapport : cholestérol / acides gras. Terroine [138 a] désigne deux caractéristiques dans le sang, pour un individu : l'indice lipémique, ou taux de cholestérol total, et le coefficient lipémique, ou rapport cholestérol / acides gras. La richesse en eau ou l'imbibition maxima, désignée par IM, est en rapport direct avec le coefficient lipocytique, désigné par CL, soit la constante

cellulaire : $K = \frac{IM}{CL}$. (Leuret et Dutrenit, [88]). Dans leurs travaux sur les complexes lipoprotéidiques, Machebœuf et Wahl [96] ont découvert un complexe lécitho-stéro-protéide, qui contient 18 % d'ester du cholestérol et possède des propriétés très voisines de celles du protoplasma ; c'est la substance A9, colloïde soluble dans l'eau, donnant des sols et des gels stables ; en solution concentrée, elle prend la forme-type du protoplasma, dite gliode, définie par Botazzi (Leuret et Dutrenit [88]). Lumière et Grange [95] ont montré l'importante action protectrice immédiate dans le plasma, que joue le cholestérol dans les chocs anaphylactiques ; l'hypocholestérolémie des maladies infectieuses graves, remplacée après guérison par une hypercholestérolémie, signe d'une immunité acquise [81], corrobore ce dernier fait ; ce rôle protecteur et antitoxique joue aussi vis-à-vis des agents chimiques (saponines) et des agents hémolytiques (eau, acides biliaires, toxines), une action importante (Leuret et Dutrenit, [88]). Le rôle du cholestérol dans l'organisme, mal connu autrefois, semble donc s'amplifier de plus en plus.

Le cholestérol total du sang

Quand nous parlons du taux du cholestérol dans le sang, il faut établir une démarcation entre le taux de stérol total, et ceux de stérol libre ou de stérol estérifié. Nous verrons plus loin ces derniers. Nous allons nous occuper pour l'instant de ce que Terroine [138 a] appelle l'indice lipémique, soit la teneur du sang en cholestérol total.

Le taux de cholestérol total est lui-même à considérer dans quatre états différents : 1° sang total ; 2° globules rouges ; 3° sérum ; 4° plasma.

La teneur du sang total en cholestérol n'a pas attiré jusqu'ici les recherches des biologistes ; nous n'avons trouvé dans nos recherches aucun auteur qui fasse mention de celle-ci.

La teneur des globules a été plus étudiée. Leuret et Dutrenit [88] la fixent à 1 gr. 15 - 1 gr. 30 pour mille ; Aujaleu, Bugnard, Colombiès et Guilhem [8] cherchent à prouver que cette teneur est variable suivant les états physiologiques et pathologiques, mais Guy Laroche et Grigaut [69], en 1936, les contredisent et affirment que la quantité de cholestérol fixée par les hématies est dans tous les cas sensiblement égale à 1 gr. 50.

La teneur du sérum est celle qui a été la plus étudiée jusqu'à ce jour ; le chiffre varie avec la méthode utilisée ; la méthode de Bloor [14 a] donne les résultats les plus élevés, soit un chiffre moyen de 2 gr. 20. Chauffard et Grigaut [81, p. 353] donnent un chiffre moyen de 1 gr. 60, avec des écarts de 1 gr. 50 à 1 gr. 80 et un minimum de 1 gr. 20. Leuret et Dutrenit [88] admettent les chiffres de 1 gr. 30 à 1 gr. 80 ; Agasse-Lafont [5 b] ceux de 1 gr. 50 à 2 gr. ; Denigès [39 a], ceux de 1 gr. 60 à 1 gr. 80 ; Derrien et Fontés [39 b], celui de 1 gr. 50 ; Hugounenq [75 a], celui de 1 gr. 70 ; tous ces auteurs ont utilisé la méthode de Grigaut. Les écarts sont grands, avec la même méthode, et à plus forte raison, avec des méthodes différentes ; la manière d'obtention du sérum, comme nous le verrons plus loin, influe également. Etant données la diversité et l'infidélité des méthodes employées, il faut prendre comme moyenne 1 gr. 60 avec Grigaut et 2 gr. 20 avec Bloor.

La teneur du plasma a été peu étudiée. Bugnard, en 1929 [18], fait remarquer l'importance que peut avoir la coagulation du sang à l'air libre sur la teneur du sérum en cholestérol total ; la variation du pH pendant la coagulation influe ; ainsi, un sérum obtenu par coagulation à l'abri de l'air présente un pH diminué et une augmentation de 0 gr. 40 de cholestérol total par rapport au plasma du même individu ; le sérum, coagulé à l'air donne un pH plus élevé et une augmentation de 0 gr. 30 de cholestérol par rapport au plasma ; dans les deux cas, le sérum contient plus de cholestérol que le plasma initial. Guy Laroche et Grigaut [69] estiment la teneur du plasma en cholestérol total égale

à 1 gr. 60 ou 1 gr. 80, ce qui semble un peu élevé par rapport aux chiffres de Bugnard.

Nous pensons avec Bugnard que la teneur du plasma en cholestérol est susceptible de donner des renseignements plus précis que la teneur du sérum ; avec la méthode de Grigaut, on peut fixer cette teneur aux environs de 1 gr. 50, compte tenu des résultats de Bugnard.

Passons maintenant aux variations physiologiques, subies par le taux de cholestérol total. Ces variations sont journalières et régulières. Bruger et Somach [17 a], fixent la valeur de ces variations, dans tous les cas normaux ou pathologiques à ± 8 % ; l'ingestion de nourriture aurait peu d'influence, mais ces variations seraient cependant un peu moindres le matin, soit : ± 3,5 % — Munoz [107] signale que les variations horaires sont en moyenne ± 6,4 % et que le régime alimentaire règle chaque jour l'amplitude de celles-ci. Leuret et Dutrenit [88] estiment que les variations physiologiques sont de valeur insignifiantes ; l'alimentation n'aurait qu'un rôle secondaire, malgré le rôle d'apport joué par certains aliments. Poutchinsky et Glouhenky [124], affirment, après des expériences probantes sur divers animaux, que le taux du cholestérol subit dans la même journée de très grandes variations, présentant deux maxima sans rapport avec les heures des repas. Quoiqu'il en soit, pour avoir la certitude d'obtenir des chiffres comparables entre eux, nous avons toujours opéré nos prélèvements, à jeun, entre huit et neuf heures du matin.

D'autres variations physiologiques sont à signaler. Leuret et Dutrenit [88], Watrin et Winiwarter [148], Aujaleu, Bugnard, Colombiès et Guilhem [8], signalent chez la femme enceinte une hypercholestérolémie, parfois atteignant 2 gr. 50.

Enfin, Khalyl [79 c] démontre que des échantillons de sang peuvent se conserver une semaine, sans qu'il y ait changement dans le taux et la répartition du cholestérol, entre les globules et le plasma ; ceci est en contradiction

avec ce que nous savons sur le vieillissement des sérums, principalement au point de vue protéidique.

Nous arrivons, après les variations physiologiques, aux variations pathologiques. Leuret [88], Gavrila et Beriaru [53], Laroche et Grigaut [67], signalent l'hypercholestérolémie dans les œdèmes, les néphrites, les maladies de la nutrition. Leuret [88], Gavrila et Beriaru [54], notent l'hypocholestérolémie, suivie d'hyperscholestérolémie à la guérison, dans les maladies infectieuses. Dans les maladies parasitaires, comme la syphilis, Leuret et Dutrenit [88], Gavrila et Hanganütz [55], ne voient pas de variations sensibles. Chez les aliénés, Ornstein [111], Claude, Targowla et Badonnel [31], Ornstein et Pahron [112], ne sont pas d'accord sur le sens des variations. Leuret et Dutrenit [88] signalent l'hypocholestérolémie dans les maladies par carence. Dans la tuberculose, Leuret et Dutrenit [88], Jullien et Rosset [76], Gavrila et Vior [56], Leuret, Caussimon et Vitte [89] sont d'avis très partagés sur la valeur de l'indice lipémique dans ce cas. Leuret [88] signale l'hypercholestérolémie comme de règle dans la rétention et la lithiase biliaire ; il ne voit par contre aucune tendance marquée dans le diabète, ni dans les maladies du sang. Leuret [88], Labbé et Nepveux [81], Labbé et Heitz [82], sont d'accord sur l'hypercholestérolémie dans les maladies vasculaires (artérites, xanthomes). De même, l'hypercholestérolémie est signalée dans la vieillesse par Pahron et M. Pahron [114], Pahron, Ornstein et Sibi [117], Eck et Desbordes [41 et 45].

Laroche et Grigaut [68] ramènent l'hypercholestérolémie à trois causes : ou l'alimentation trop riche en graisses, ou la viciation du métabolisme général, ou le déséquilibre des centres régulateurs et transformateurs (foie, rate). Eck et Tixier [46], Pahron et Ornstein [115], Leuret et Dutrenit [88], Lœper, Lemaire et Tonnet [93], ont préconisé comme solubilisants la thyroxine, la choline, l'insuline et le phosphore.

L'indice lipémique de Terroine [138 a] a donc acquis, comme nous venons de le voir, une grande valeur en biologie. Nous allons voir maintenant comment le cholestérol est distribué dans le sang.

Les différents états du cholestérol dans le sang

Nous avons parlé jusqu'ici du cholestérol total, sans considérer sous quelle forme chimique celui-ci existait dans le sang. Le cholestérol est réparti sous deux formes différentes. La plus importante partie du cholestérol se trouve engagée dans des combinaisons avec les acides gras ; grâce à sa fonction alcool, il constitue des esters, qui existent, comme nous allons le voir, en majeure partie dans le plasma. Une partie du cholestérol n'est liée à aucun autre composé, du moins d'une façon apparente ou connue ; c'est le cholestérol libre, qui existe en majeure partie dans les globules.

Le cholestérol total est la somme de ces deux quantités. Depuis de nombreuses années, on a songé à étudier le rapport qui pouvait exister entre les deux formes du cholestérol sanguin. Le cholestérol libre étant en quantité plus faible, les auteurs se sont attachés à mesurer la valeur du rapport : cholestérol estérifié/cholestérol total, et ceci principalement dans le sérum.

En 1911, Laudat, dans sa thèse sur les lipoïdes [82 a], attribue à ce rapport chez l'homme normal, une valeur variant de 0,73 à 0,79. En 1927, Gardner et Gainsborough [50], reprennent plus spécialement cette étude, et après de nombreuses expériences sur le plasma, donnent comme valeurs moyennes celles de 0,70 chez l'homme et de 0,66 chez la femme ; de plus, ils font remarquer que les variations de ce rapport s'observent surtout dans le plasma, le taux de cholestérol des globules restant fixe et, en majeure partie constitué par du cholestérol libre. Un peu plus tard les mêmes auteurs [52] constatent que suivant le régime

alimentaire le cholestérol estérifié varie ; le cholestérol libre se maintient à peu près fixe ; ils en concluent la nécessité de prélever le sang à jeun, pour avoir des rapports normaux. Khalyl [79 c] confirme que le cholestérol des globules est en majeure partie du cholestérol libre, alors que celui du plasma est en majorité estérifié. Grigaut [64] donne au rapport une valeur de 0,60 à 0,70, chez le sujet normal, dans le sérum. Velluz [141 et 142], étudiant ce rapport sur des sujets normaux, et sur des immunsérums donne comme valeur normale de celui-ci, dans le sérum, le chiffre de 0,68 à 0,72.

Le rapport cholestérol ester / cholestérol total semble donc avoir comme valeur moyenne le chiffre de 0,70 ; chez un sujet normal, ses variations sont très faibles, du moins si l'individu est à jeun. Le prélèvement du sang pour la mesure de ce rapport devra donc être effectué sur un sujet rigoureusement à jeun.

Dans des cas pathologiques, ce rapport subit des variations très fortes. Laudat [82 a] signale des cas où ce rapport est très bas ; tel un ictère catarrhal (0,44), et un ictère lithiasique (0,13). Thannhauser, puis Kondo et Schültz supposent que le foie est l'organe régulateur, par son estérase, du rapport ci-dessus ; Adler, Lemmal et Epstein [5], dans les lésions hépatiques signalent une diminution de celui-ci ; de Morais-Sarmento et Bruno da Costa [105] trouvent dans des cas de lésions intenses du foie des rapports bien inférieurs à 0,70. Plus récemment, Sannié et Truhaut [131] signalent un cas de précipitation spontanée du cholestérol dans le sérum, le rapport étant abaissé chez le sujet jusqu'à 0,25. Khalyl [79 c] signale en outre que dans les cas pathologiques, le cholestérol estérifié apparaît dans les globules alors qu'il diminue dans le plasma.

On attribue par conséquent aux variations de ce rapport des indications sérieuses en vue du contrôle du fonctionnement du foie. Il est en outre, particulièrement sensible aux changements qui peuvent se produire dans les rapports entre le cholestérol et les autres lipides. Il semble encore

qu'il doive régler en partie la solubilisation ou la précipitation du cholestérol, étant donné qu'il indique la quantité de cholestérol fixée sur les lipides, relativement au cholestérol total.

Nous attacherons dans l'étude que nous entreprenons une grande valeur à ce rapport, susceptible de nous fournir de précieux renseignements.

CHAPITRE II

LE POUVOIR CHOLESTÉROLYTIQUE

Définition et historique

Nous venons de voir précédemment que le cholestérol est un test biochimique important, qui traduit tous les déséquilibres de l'organisme et principalement ceux du métabolisme lipidique. Le cholestérol, corps insoluble dans l'eau, donne des solutions colloïdales ; divers facteurs activeront ou diminueront cette solubilisation. Comme dans toutes les pseudo-solutions, au moment des variations d'équilibre, nous verrons apparaître des floculations, qui se traduiront par des dépôts de stérol dans les tissus et principalement dans les canaux sanguins. Les anciens dosages du cholestérol, soit total, soit libre ou estérifié, soit même du rapport ester/total, ne nous renseignent que sur la teneur brute du sang, en ce corps ou en une de ses formes ; ils ne nous donnent aucune indication sur la tendance générale, floculante ou dissolvante, de ce milieu complexe. Cette tendance, si nous pouvons la connaître et même l'évaluer, sera précieuse pour le clinicien ; conjuguée avec l'indice lipémique de Terroine [138 a], elle permettra de juger l'état du sujet et la gravité du cas. Une réaction nouvelle était donc nécessaire. Cette réaction a été définitivement mise au point *in vitro*, à l'heure actuelle. Le plasma ou le sérum est placé à l'étuve à + 37° C pendant quarante-huit à soixante-douze heures ; il est mis en présence pendant ce laps de temps de cholestérol pulvérisé, dont on l'a addi-

tionné à raison de 0 gr. 02 par centimètre cube. Après séparation soigneuse du cholestérol additionnel, on dose celui qui est resté dissous dans le plasma ou sérum. La différence, affectée du signe plus ou moins, entre la teneur du plasma chauffé et celle du plasma non chauffé, nous indique s'il y a eu solubilisation ou précipitation ; elle est ramenée à 100, par rapport à la teneur en cholestérol du plasma non chauffé, et nous obtenons ainsi une valeur comparable aux valeurs déjà obtenues sur d'autres sujets. On a ainsi défini un nouveau test biochimique, que l'on a désigné sous le nom de pouvoir cholestérolytique. Voyons maintenant la genèse de cette réaction.

En 1928, Decourt et Lœper [36], essaient sur le sérum sanguin une floculo-réaction à base de cholestérol ; ils utilisent une solution colloïdale de celui-ci à 1 % dans l'eau. Ils étudient les floculations produites par un centimètre cube de celle-ci sur diverses dilutions de sérum ; les sérums normaux ne floculent pas, alors que dans certains cas pathologiques des précipitations plus ou moins intenses apparaissent. Sur cent cas [37], les mêmes auteurs essaient de montrer le parallélisme pouvant exister entre cette floculo-réaction et la réaction de Bordet-Wassermann ; afin de pouvoir remplacer celle-ci par celle-là ; leurs résultats sont contradictoires.

La même année, Lœper, Lemaire et Lesure [31] signalent le pouvoir dissolvant du sérum vis-à-vis du cholestérol ; celui-ci est mis en présence d'une certaine quantité de stérol cristallisé. puis maintenu à l'étuve à +37° C pendant quarante-huit à soixante-douze heures, ensuite filtré à plusieurs reprises ; enfin le stérol dissous est dosé par la méthode Grigaut. Ils donnent à cette réaction le nom de : pouvoir cholestérolytique ; ils remarquent que celle ci ne dépend pas du taux de cholestérol total, et qu'elle ne présente aucun parallélisme ni avec la floculo-réaction précédente, ni avec l'intra-dermoréaction de Lœper et Lemaire [91 a].

Michaïl et Vancea [102], en 1928 également, étudient ce

nouveau pouvoir cholestérolytique ; ils remarquent que le sérum humain en général a peu de pouvoir dissolvant et que le cholestérol du sang précipite facilement ; ceci est en contradiction avec les derniers travaux ; ces auteurs ont étudié d'ailleurs uniquement des sujets atteints de maladies oculaires ; des dépôts de cholestérol apparaissent dans les cataractes ; leurs résultats n'ont donc rien d'extraordinaire et ceux-ci confirment, à notre avis, la valeur du pouvoir cholestérolytique.

En 1934, Eck et Desbordes [41], reviennent sur le pouvoir cholestérolytique, tombé dans l'oubli depuis 1928. Etudiant la capacité du sérum à dissoudre ou à précipiter le cholestérol chez les vieillards, ils concluent que, dans la vieillesse, le sang est en général incapable de dissoudre du stérol, même sans que la teneur en cholestérol total soit précisément élevée. Au sujet de recherches sur le métabolisme du cholestérol [42], les mêmes auteurs sont frappés par le fait que le cholestérol subit des variations de faible amplitude, alors que le pouvoir cholestérolytique subit au contraire des variations très sensibles, passant du négatif au positif suivant l'influence du traitement ; ils concluent donc à l'importance de ce dernier. Recherchant les variations de ce pouvoir sur des sujets d'âges divers [45], les mêmes auteurs concluent à une diminution du pouvoir cholestérolytique avec l'âge ; chez l'enfant, le sérum est donc en équilibre ; chez l'adulte, l'équilibre existe encore, quoique des écarts assez grands apparaissent déjà ; chez le vieillard, dans la majorité des cas, l'équilibre n'existe plus et la précipitation est de règle. De ceci, on peut donc conlcure que le pouvoir cholestérolytique n'a pas qu'un simple signe de précipitation ou de solubilisation, mais qu'il renseigne encore d'une façon précise sur l'âge biologique d'un sujet sain en apparence.

Une objection a été élevée contre le pouvoir cholestérolytique : le séjour du sérum à l'étuve n'amènerait-il pas des transformations ? Cette observation a été prévue par Lœper, Lemaire et Lesure [91], du moins quant au taux

de cholestérol total; ils ont fait subir à des sérums un chauffage identique à celui subi par le sérum additionné de cholestérol; la comparaison avec du sérum non chauffé a montré que la variation de taux est nulle, à condition d'opérer le chauffage en tubes rigoureusement stériles.

Le pouvoir cholestérolytique est par conséquent une donnée nouvelle, apportant bien plus de renseignements que la détermination brutale de la teneur en cholestérol total ; elle nous renseigne à la fois sur la tendance colloïdale du sérum, sur l'âge biologique du sujet et enfin sur la saturation ou la non-saturation du sang *in vivo* par le cholestérol.

Variations du pouvoir cholestérolytique

Passons maintenant à la valeur du pouvoir cholestérolytique ; celle-ci n'est pas constante ; elle est tout-à-fait relative et dépend de l'âge du sujet. On peut cependant admettre comme chiffres moyens, ceux cités par Eck et Desbordes [45], qui ont étudié systématiquement, la valeur du pouvoir cholestérolytique suivant l'âge. Chez les enfants, entre huit et quinze ans, le taux moyen de cholestérol est de 1,46, le pouvoir cholestérolytique de +1 %. Chez les adultes, de vingt-quatre à quarante-et-un ans, le taux moyen de cholestérol est de 1,76, le pouvoir cholestérolytique de + 4,8 %. Chez les vieillards, de soixante à quatre-vingt-un ans, le taux moyen de cholestérol est de 1,77 ; celui du pouvoir cholestérolytique, en moyenne de —15 %, diminue de plus en plus avec l'âge. Ces valeurs ne sont encore que relatives, quoique moyennes. Chez l'adulte, si le pouvoir cholestérolytique devient nul ou bien très élevé en valeur positive, ceci n'indiquera pas un cas pathologique ; l'augmentation en valeur absolue dans le sens positif sera au contraire un signe clinique très favorable, ainsi que le montrent Edgard Rosa [47] et Eck et Desbordes [42]. Chez le vieillard, d'un âge biologique avancé, la valeur moyenne de — 15 %, si

elle est fréquente, n'en traduit pas moins un déséquilibre du sérum ; elle est donc nettement pathologique. On peut donc conclure de ceci que toute valeur négative du pouvoir cholestérolytique doit être considérée comme pathologique.

Les variations physiologiques, soit journalières, soit au cours de la digestion, soit au cours de la grossesse, du pouvoir cholestérolytique, ne paraissent pas avoir été étudiées systématiquement jusqu'ici. On peut répéter à leur sujet tout ce que nous avons dit au sujet du cholestérol ou du rapport : cholestérol ester / cholestérol total; notamment, pour les prélèvements, il sera de règle de les faire entre 8 et 9 heures du matin, sur un malade à jeun. L'étude des variations physiologiques est très délicate, la quantité de sang à prélever pour chaque dosage étant relativement élevée, comme nous le verrons plus loin.

Toute valeur du pouvoir cholestérolytique négative sera pathologique, quel que soit l'âge du sujet. Le déséquilibre du sérum sera d'autant plus grave, que ce pouvoir sera plus faible en signe négatif (soit plus grand en valeur absolue). Un sujet, ayant —80 % de pouvoir cholestérolytique, sera dans un état beaucoup plus grave que celui dont le pouvoir sera de —10 %. A notre connaissance, aucune étude systématique n'a été faite du pouvoir cholestérolytique dans différents cas pathologiques ; on peut présumer, *à priori*, que toute maladie amenant des hypercholestérolémies devra être suspectée d'amener chez le sujet le pouvoir cholestérolytique à une valeur négative, d'autant plus forte que le cas sera plus grave (telles les néphrites, les œdèmes, les ictères, les artérites, la vieillesse). Eck et Desbordes [44] ont d'ailleurs signalé dans le cynarin de l'artichaut, un agent de stimulation hématique, qui augmente la valeur du pouvoir cholestérolytique.

CHAPITRE III

LE CHOLESTÉROL ET SES RAPPORTS AVEC LES AUTRES CONSTITUANTS DU SANG

Après notre étude sur la réaction nous permettant de mesurer l'état d'équilibre du sang, nous allons étudier les rapports qui peuvent exister entre le cholestérol, le rapport cholestérol ester / cholestérol total et le pouvoir cholestérolytique, d'une part, et les autres composants du sang : lipides, protéides, sucre, d'autre part. Nous chercherons à en dégager quelques idées sur la solubilisation du cholestérol dans le sang, idées qui nous permettront de fixer le but de notre travail.

Le cholestérol et les lipides

Mayer et Schaffer [100 a], Terroine [138 a] désignent le rapport : cholestérol / acides gras, sous le nom de coefficient lipocytique ou lipémique, comme une constante cellulaire. Chauffard et son école (Brodin, Laroche, Grigaut) [27, 28, 29] ont démontré depuis 1911, que la cholestérolémie suit fidèlement la lipémie ; Widal, Weil et Laudat [149] concluent de même ; Bloor [12] affirme à son tour l'existence d'un parallélisme constant entre les matières grasses et le cholestérol. En 1921, Lœper, Debret et Tonnet [92] trouvent que le rapport : cholestérol total / autres lipides, est constant et égal chez les individus normaux à environ 0,60. En 1924, Grigaut et Yowanowitch [70], sous la direction de Chauffard, étudient le rapport : cholestérol + lécithine / graisses totales, et le trouvent égal et constant, chez l'homme sain, à 0,45. En 1934, Pahron, Ornstein et

Sibi [117] déterminent la valeur du rapport : cholestérol/lipides, et le trouvent égal à 0,28 chez l'enfant, 0,31 chez l'adulte, et 0,27 chez le vieillard, donc sensiblement constant.

Grigaut et Yowanowitch [70], Pahron, Ornstein et Sibi [117], Labbé et Nepveux [81], donnent au rapport : cholestérol/lécithine, les valeurs de : 0,89 ; de 0,88 chez l'adulte et 0,97 chez le vieillard ; et de 1. Ornstein, Sibi et Branover [113] montrent qu'un antagonisme existe entre la lécithine et le cholestérol dans le sang, et mettent en évidence la constance du rapport.

Dans les cas pathologiques. Labbé et Nepveux [81] signalent une baisse du rapport : cholestérol / lécithine, mais dans quelques cas d'ictère seulement ; par contre, Grigaut et Yowanowitch [70] montrent que ce rapport garde toujours sa valeur constante quel que soit le cas. Grigaut et Yowanowitch signalent en outre que le rapport : cholestérol +lécithine / graisses totales, subit dans la plupart des cas des variations très nettes, mais sans aucune constance ni aucune règle. Dörle et Weiss [40] signalent aussi dans l'hypertension et l'artériosclérose, une augmentation des lipides accompagnée d'augmentation du cholestérol. Pahron, Ornstein et Sibi [117], Pahron et Ornstein [116], constatent que les taux des protéïdes, des lipides totaux, des acides gras, du cholestérol et de la lécithine, augmentent d'une maniére régulière de l'enfance à la vieillesse ; les rapports : cholestérol / lécithine, et : cholestérol / lipides, ne subissent pas de variations sensibles.

Nous admettrons donc, avec les différents auteurs, que le cholestérol suit fidèlement les variations des lipides totaux du sang. Les rapports entre lipides et cholestérol semblent surtout être des rapports d'estérification, en vue de la solubilisation du stérol insoluble ; l'étude du rapport : cholestérol ester / cholestérol total, nous apportera donc tous renseignements utiles.

Le cholestérol et les protéides

Le cholestérol libre peut être adsorbé par les protéides. Il est donc nécessaire de rechercher si un lien n'apparaît pas entre eux, dans les divers travaux faits jusqu'ici.

Gardner et Gainsborough [51], en 1927, trouvent dans les protéides précipités par les électrolytes, 16,36 % du cholestérol total, fixés presque uniquement sur l'englobuline. Loiseleur et Morel [94] supposent que le cholestérol, colloïde négatif, peut être adsorbé par d'autres colloïdes ; ils ne trouvent cependant aucun rapport entre l'état pathologique et les répartitions diverses du cholestérol sur les différentes protéides.

En 1929, Machebœuf, d'abord seul [96], puis avec Wahl [99], étudie les relations entre le cholestérol et les protéides. Il nomme index lipo-albuminique, la quantité de lipides entraînée par cent d'albumine précipitée ; l'index normal est inférieur à 10 gr. ; il s'élève parfois à 90, dans des cas pathologiques. Ces auteurs isolent par la suite la substance A.9, soluble dans l'eau, riche en lécithine et en cholestérol adsorbés par des protéides, et contenant 18 % de cholestérol, sous forme d'ester ; l'alcool bouillant, seul, peut séparer le cholestérol existant dans ce colloïde. Ce complexe spécial, prenant la forme gliode, donne lieu à des précipitations analogues à la cataracte.

Abrami et Robert-Wallich [1], en 1929, notent dans les cirrhoses du foie, un abaissement du taux des protéides et une inversion du rapport : sérine / globuline. Achard et Arcand [3], contredisent Fishberg [49], la même année : celle-ci avait cru trouver une diminution du taux de protéides toujours antagoniste de l'augmentation des lipides ; ils ne retrouvent pas cet antagonisme, et concluent que la simple comparaison des protéides totales et des lipides totaux ne suffit pas pout étudier les équilibres protéidiques et lipidiques. En 1934, Pahron, Ornstein et Sibi [117] voient très nettement augmenter le rapport : cholestérol/

protéides, de l'enfance à la vieillesse ; il passe de 0,016 à 0,022.

En 1933, Velluz [142] trouve dans les immunsérums une diminution de la sérine, avec augmentation de la globuline ; en même temps, le cholestérol total diminue ; de là, il suppose que ce serait principalement la sérine qui retiendrait le cholestérol.

En 1934, Mauriac, Serventie et Demenier [100], reprennent un travail de Rabinowitsch [125] ; ce dernier trouvait dans les cas d'hypercholestérolémie, une teneur en protéides normale et un rapport : sérine / globuline, inchangé. Mauriac, Serventie et Demenier constatent au contraire des oscillations antagonistes entre le taux de cholestérol et le rapport : sérine / globuline, sans que le taux de protéides totales change ; à une augmentation du cholestérol correspond une diminution du rapport, à une diminution du cholestérol, une augmentation du rapport.

En 1936, Chabrol, Cottet et Salet [23] modifiant la réserve alcaline par injection de solutions bicarbonatées, remarquent une baisse de 50 % sur le cholestérol et de 30 % sur les protéides totaux ; ils en concluent une liaison probable entre eux.

En 1934, Eck et Desbordes [43], étudient les rapports existant entre le pouvoir cholestérolytique et les protéides totales obtenues par précipitation saline, sur lesquelles ils dosent le cholestérol entraîné ; ils en concluent que le pouvoir cholestérolytique dépend plus des protéides que des lipides et qu'il est fonction de la saturation des premières en cholestérol. En 1935, les mêmes continuent ces travaux [45] et concluent que le rapport cholestérolytique devient négatif quand la quantité de cholestérol fixé sur les protéides arrive à saturation et quand la solidité des complexes lipo-protéidiques du sérum diminue.

Que déduire de tous ces résultats ? Une partie du cholestérol est sans aucun doute absorbée par les protéides, la substance A. 9 existant dans le sang ; cette partie est cependant faible, soit 16,36 % d'après Gardner et Gains-

borough. Les relations entre la cholestérol et le rapport sérine / globuline semblent moins certaines, les auteurs parlant de certains cas pathologiques seulement et étant en contradiction entre eux. Enfin, d'après Eck et Desbordes, le pouvoir cholestérolytique semble dépendre principalement des protéides, ce qui reste à démontrer.

Le cholestérol et le glucose

C'est le seul autre constituant du sang dont les variations ont été comparées à celles du cholestérol.

Gœbel [58] prétendait qu'un rapport antagoniste existait entre le sucre et le cholestérol. Castex et Schteingart, [22], après 900 expériences, concluent à l'inexistence de toute relation entre le cholestérol, le sucre ou l'azotémie. Rosenthal [128 a] pense qu'un rapport doit exister entre le sucre et le cholestérol, mais il ne peut le prouver. Aper, Pechery et Rouillard [5a], Biscous et Rouzaud [11a], trouvent ce rapport dans d'assez nombreux cas, mais dans le diabète seulement; Leuret et Dutrenit [88] trouvent aussi dans cette maladie une hypercholestérolémie concordant avec l'hyperglycémie.

Il semble donc que, sauf dans le diabète, le cholestérol et le glucose n'ont pas de rapport.

La solubilisation du cholestérol dans le sang

Voyons maintenant quels sont les complexes solubles du cholestérol que nous connaissons. Velluz seul [140], puis avec Bouchara [193], note que les solutions colloïdales du cholestérol, d'apparence laiteuse, n'ont que des rapports lointains avec les composés de l'organisme ; grâce à des solutions d'acides ricinoléique, linolénique et linoléique, ces auteurs arrivent à créer des solutions claires, sans effet Tyndall, contenant 2, 3 et 4 pour mille de cholestérol. Le cholestérol libre est également très soluble dans

les solutions de sels biliaires : Moore et Parker [104], Gérard [57]. Un ester très soluble du cholestérol a été signalé par Schönheimer et Breusch [133] : c'est le sel sodique du monoester de l'acide 1, 2 ,3, 4, butane tétracarbonique. Enfin, comme complexe lipo-protéidique soluble, nous avons déjà signalé la substance A. 9 [96]. De tous ces composés, seule la substance A. 9 a été mise en évidence jusqu'ici dans le sang. L'état probable du cholestérol dans le sang est donc tel que le définissent Labbé et Nepveux [81] : soit libre, soit estérifié, comme oléate ou palmitate, soit sous forme de protéocholestéride ; de plus, on peut signaler que dans les globules, la majorité est à l'état libre, alors que dans le plasma c'est la forme ester qui l'emporte. Cahn et Houguet [20] ont poussé encore plus loin l'hypothèse : la mobilisation des lipides se ferait sous forme d'esters du cholestérol, et le foie les distribuerait sous forme de phosphatides.

Quels seront donc les corps qui semblent devoir régler la solubilisation du cholestérol, c'est-à-dire le pouvoir cholestérolytique ? Sannié et Truhaut [131] signalent un cas de précipitation spontanée du cholestérol dans un sérum, au cours d'un ictère massif du foie ; tous les lipides et les protéides sont très augmentés ; le rapport : cholestérol ester / cholestérol total, est par contre très diminué, soit 0,25. Eck et Desbordes, d'après leurs travaux [45], supposent que la précipitation du cholestérol serait réglée par les variations vers l'acidose, par celles du rapport azote uréique / azote protéique, et par la facilité de clivage des complexes lipoprotéidiques ; ces trois conditions peuvent se réunir en une seule, semble-t-il : les variations du pH sanguin ; en effet, du moment qu'il est question de colloïdes, le pH prend une importance prépondérante ; il semble que toute variation de celui-ci produira une modification du pouvoir cholestérolytique, sans même que les lipides ou les protéides interviennent. Eck et Desbordes envisagent un quatrième facteur, qui est la saturation des protéides par le cholestérol ; d'après ce que nous avons vu

plus haut, le taux des protéides n'a qu'une faible importance, les variations qu'il subit étant minces ; le rapport sérine / globuline subit par contre des écarts très importants, dont la concordance avec ceux du cholestérol est encore très discutée ; il est donc préférable d'étudier la formule protéidique, beaucoup plus sensible que le taux des protéides totales.

La solubilisation du cholestérol semble donc dépendre de trois facteurs principaux : le rapport cholestérol ester / cholestérol total, concernant les lipides ; le rapport sérine / globuline, représentant les protéides ; et enfin le pH sanguin, qui règle les phénomènes d'adsorption ou de clivage des complexes. Nous nous intéresserons uniquement aux deux premiers facteurs, c'est-à-dire aux rapports : cholestérol ester / cholestérol total, et sérine / globuline ; nous les étudierons comparativement au pouvoir cholestérolytique, ce qui éclairera sur la manière dont se solubilise le cholestérol, soit libre et adsorbé sur les protéides, soit estérifié et dissous par les lipides. Nous définirons ainsi le rôle joué par les lipides et les protéides, dans la solubilisation du cholestérol.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES
ET RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX
CONCLUSIONS TIRÉES DE CEUX-CI

CHAPITRE IV

BUT DE NOTRE ÉTUDE

Nous avons vu précédemment, d'après les auteurs, quels sont les facteurs dont semble dépendre la solubilisation du cholestérol. Nous nous sommes proposés de définir le rôle joué par les lipides et les protéides dans ce phénomène physique. Il semble, d'après les auteurs, et en ce qui concerne les lipides, que le principal rôle de ceux-ci consiste à fixer et à solubiliser le cholestérol sous forme d'esters ; l'étude du rapport : cholestérol ester/cholestérol total, nous apportera donc tous les renseignements utiles sur l'équilibre lipidique du sujet. En ce qui intéresse les protéides, les différents auteurs ont constaté que le cholestérol et sa solubilisation étaient fonction plus de la formule protéidique que du taux de protéides totales ; la formule protéidique est caractérisée par le rapport sérine / globuline ; le rôle des protéides semble être d'adsorber le cholestérol libre, du moins en partie ; mais ceci n'a rien d'absolu, car elles adsorbent aussi des esters (substance A. 9). Nous étudierons à la fois le taux de protéides totales et la valeur du rapport : sérine - globuline.

Nous allons étudier la solubilisation du cholestérol, par la mesure du pouvoir cholestérolytique. Nous avons voulu en même temps, pour plus de sûreté, examiner le mécanisme de cette réaction. Pour cela, nous avons chauffé à + 37° C. pendant le même temps, au même moment, avec le plasma additionné de cholestérol, le plasma seul, sans cholestérol ; sur ce témoin, nous avons opéré les mêmes dosages de cholestérol total et estérifié que sur le plasma

additionné de stérol ; ceci nous permettra de voir les variations que le taux de cholestérol total et celui de cholestérol ester peuvent subir pendant le chauffage, et par suite de constater si le plasma modifie sa composition pendant ce même temps. D'ordinaire, on exprime le pouvoir cholestérolytique par rapport au cholestérol total ; pour observer le mécanisme de la réaction, nous avons calculé le même rapport, mais en fonction du cholestérol ester et en fonction du cholestérol libre ; nous obtenons ainsi trois pouvoirs cholestérolytiques différents, l'un s'adressant au stérol total, l'autre aux esters et le troisième au cholestérol libre ; grâce à ceux-ci, nous constaterons si le cholestérol total, le cholestérol ester et le cholestérol libre, sont susceptibles, dans un même sang, d'une solubilisation identique. Enfin, nous avons calculé la valeur du rapport : cholestérol ester / cholestérol total, dans le plasma additionné de cholestérol et chauffé à l'étuve, afin de nous rendre compte des variations que pouvait ainsi subir la distribution du cholestérol.

Dans notre travail, nous doserons donc, le cholestérol total et le cholestérol ester dans le plasma non chauffé, dans le plasma chauffé sans cholestérol et dans celui chauffé en présence de cholestérol ; et, dans le sérum non chauffé, les protéides totales et la globuline. Partant de ces résultats, nous calculerons : le cholestérol libre, par différence, dans le plasma non chauffé et dans le plasma chauffé en présence de cholestérol ; le rapport cholestérol ester / cholestérol total, que nous désignerons par E/T pour simplifier, dans le plasma non chauffé ; ce même rapport, que nous désignerons par E'/T', dans le plasma chauffé avec du cholestérol ; nous établirons ensuite les trois pouvoirs cholestérolytiques : total, désigné par x, ester, désigné par x', et libre désigné par x''. Enfin, nous calculerons la sérine par différence, et le rapport sérine / globuline, désigné conventionnellement par S/G, dans le sérum non chauffé.

Nous nous proposons donc d'étudier à la fois le mécanisme du pouvoir cholestérolytique et la solubilisation du cholestérol. Nous avons groupé en quelques questions les

principaux points sur lesquels se portera notre attention. Voyons d'abord les questions se rapportant au fonctionnement de la réaction dite pouvoir cholestérolytique :

1° Le cholestérol, total ou estérifié, varie-t-il pendant le chauffage du plasma sans cholestérol ?

2° Si le rapport E/T varie pendant le chauffage, dans quel sens variera le rapport E'/T', dans le plasma chauffé en présence de cholestérol ?

3° Les pouvoirs cholestérolytiques total x et ester x' ont-ils une relation avec les taux de cholestérol total ou estérifié ?

4° Les pouvoirs cholestérolytiques total x, ester x' et libre x'' ont-ils la même valeur ?

Les questions suivantes se rapporteront à la solubilisation du cholestérol ou plutôt à sa variation d'état et au rôle joué dans ce phénomènepar les lipides ou les protéides.

5° La variation du cholestérol total (pouvoir x) est-elle fonction du rapport E/T ?

6° Cette même variation dépend-elle du taux de protéides totales ou du rapport S/G ?

7° La variation du cholestérol ester (pouvoir x') est-elle fonction du rapport E/T ?

8° Cette même variation dépend-elle du taux de protéides totales ou du rapport S/G ?

9° La variation du cholestérol libre (pouvoir x') est-elle fonction du rapport E/T ?

10° Cette même variation dépend-elle du taux de protéides totales, de la sérine, de la globuline, ou du rapport S/G ?

Pour mieux mettre en évidence certains résultats que nous aurons obtenus, nous établirons, si cela est nécessaire, des graphiques représentantifs des variations enregistrées.

Dans un autre ordre d'idées, pour nous rapprocher le

plus possible de ce qui se passe *in vivo*, nous opérerons toutes nos expériences sur du plasma obtenu à partir de sang rendu incoagulable par addition d'oxalate neutre de potassium. Ceci ne présente que des avantages. Le premier est que le plasma existe en réalité dans le corps humain, alors que le sérum a déjà subi des transformations colloïdales étrangères à l'organisme ; ainsi que le montre Bugnard [18], la coagulation du sang augmente le taux de cholestérol du sérum, aux dépens des globules. Le deuxième avantage sera un résultat plus rapide ; le clinicien recherche beaucoup cela ; le repos de 24 à 36 heures nécessaire pour obtenir un sérum clair et un caillot rétracté, est ainsi supprimé.

Nous choisirons comme cas les maladies les plus diverses; nous rechercherons cependant les malades atteints d'hypercholestérolémie. Nous aurons ainsi probablement des pouvoirs cholestérolytiques élevés ; d'autre part, les cas étant très divers, nous n'aurons pas à craindre qu'une particularité, dûe spécialement à une certaine maladie, ne vienne embarrasser et altérer nos résultats.

Au point de vue du choix des méthodes, nous chercherons à obtenir une méthode rapide ; les cliniciens demandent les résultats dans les plus brefs délais ; le pouvoir cholestérolytique, avec les 48 heures minima de séjour à l'étuve, demande trois jours pour être mesuré ; une méthode pratique et rapide, tout en étant suffisamment précise, est nécessaire. C'est ce que nous nous efforcerons d'obtenir, en supprimant toutes les filtrations et tous les séchages à l'étuve, que nous remplacerons par des centrifugations et des traitements par l'alcool-éther et par le vide.

CHAPITRE V

LE DOSAGE DU CHOLESTEROL ET DE SES ESTERS

Méthode de prélèvement

Nous avons vu quelles étaient les variations journalières du taux de cholestérol et leur amplitude. Pour obtenir des renseignements comparables entre eux, tous nos prélèvements de sang ont été effectués entre 8 et 9 heures du matin, sur des sujets à jeun de préférence ; ils ont été faits par ponction veineuse.

Le sang est recueilli dans des flacons bouchés émeri de 125 centimètres cubes, contenant douze perles de verre de 3 millimètres et 0 gr. 12 d'oxalate neutre de potasse. La quantité de sang prélevée étant de 50 à 60 centimètres cubes, la proportion d'anticoagulant est de 2 à 3 pour mille, et le volume supérieur du flacon permet une agitation immédiate, aussi vive qu'il est nécessaire pour éviter une coagulation même légère du sang prélevé. Ce sang est apporté au laboratoire dans les plus brefs délais, ceci afin d'éviter, soit un commencement de coagulation par défaut d'agitation, soit une hémolyse partielle.

Dès son arrivée, le sang est soumis à une centrifugation immédiate ; placé dans un tube de centrifugeuse fermé par un capuchon métallique à vis, la vitesse est d'abord de 500 tours, puis de 1.000, de 2.000 et enfin de 3.000, en passant d'un plot à l'autre à chaque minute ; la centrifugation est ainsi réalisée par une vitesse de 3.000 tours pendant cinq minutes et pour terminer, la vitesse est portée pendant quelques secondes à 6.000 tours.

On obtient ainsi un plasma oxalaté incoagulable que l'on décante dans un tube de centrifugeuse du même type. Par ce procédé, la quantité du plasma retirée varie entre 22 et 28 centimètres cubes pour 50 centimètres cubes de sang ; ce plasma est jaune clair, exempt d'hémolyse, mais contient encore le fibrinogène.

Sur ce plasma, nous prélevons 7 centimètres cubes que nous mettons dans un tube à centrifuger conique, avec 0 gr. 14 de cholestérol cristallisé Poulenc R. P. pulvérisé; et 7 centimètres cubes que nous mettons dans un tube identique, sans cholestérol. Ces tubes sont rigoureusement stérilisés, au préalable ; après remplissage, ils sont bouchés avec un bouchon de liège stérile et placés immédiatement à l'étuve réglée à 37-40° ; ils serviront à la mesure du pouvoir cholestérolytique. Nous prélevons ensuite 5 centimètres cubes de plasma, exactement mesurés avec une pipette à écoulement total, à mouillage, que nous versons goutte à goutte, et en agitant, dans un flacon jaugé de 100 centimètres cubes, contenant déjà 50 centimètres cubes de mélange alcool-éther ; ceux-ci serviront au dosage du cholestérol avant chauffage.

Le plasma restant dans le tube à centrifuger est évalué, et additionné de chlorure de calcium pur anhydre dans les proportion de 3 pour mille ; le tube, fermé par son capuchon est placé dans une glacière, où se maintient une température de + 4° à + 5°C, pendant 24 à 48 heures, Après ce laps de temps, le tube est ouvert, le caillot adhérent aux parois est décollé à l'aide d'un petit scalpel, et on centrifuge à 6.000 tours pendant trois ou quatre minutes. Après la centrifugation, le caillot est rétracté, et on prélève 3 centimètres cubes de sérum, qui sont versés lentement dans un tube à centrifuger, à vis et à capuchon métallique, préalablement taré ; ils sont traités immédiatement en vue du dosage des protéides. La quantité de plasma nécessaire aux expériences est donc de 22 centimètres cubes au total, entre le plasma et le sérum. Une quantité de sang de 60 centimètres cubes environ est nécessaire pour effectuer tou-

tes les recherches, certains sujets ne donnant guère plus de 22 à 23 centimètres cubes de plasma pour 50 centimètres cubes de sang.

Nous allons voir plus loin que la durée totale de l'expérimentation pour un sang est de trois jours environ. D'autre part, la quantité de sang prélevée, nécessairement importante pour cette étude complexe, a été réduite au minimum, soit 50 à 60 centimètres cubes. Ceci est indispensable, car Gruszewska et Roussel [73], Machebœuf et Sandor [38], Machebœuf et Wahl [99], ont signalé que, au cours de saignées successives rapprochées ou bien de saignées importantes, atteignant 100 centimètres cubes, le rapport cholestérol / protéides, subissait des variations importantes ; il en est probablement de même pour les autres constituants du sang ; le chiffre de 50 à 60 centimètres cubes est donc un maximum si l'on veut obtenir des dosages corrects.

Les diverses méthodes de dosage du cholestérol

Deux méthodes principales existent, dont sont dérivées beaucoup d'autres : 1° les méthodes basées sur la colorimétrie et principalement sur la réaction verte de Liebermann ; 2° Les méthodes basées sur la pesée d'un précipité complexe insoluble digitonine-cholestérol, encore assez mal défini. Notre étude critique se portera sur la précision des méthodes et sur les quantités de sang qu'elles nécessitent.

Dosage du cholestérol total. — Les méthodes les plus courantes utilisent la réaction de Liebermann ; la plus connue est celle indiquée par Grigaut en 1913 [62]. Bloor, en 1916 [14 a] publie une méthode, qui modifie celle de Grigaut au point de vue extraction en la rendant meilleure ; cette méthode est, de toutes, celle qui donne les chiffres les plus élevés de cholestérol sanguin. Laurent-Gérard, en 1928 [83] améliore le rendement de la méthode de Grigaut en opérant au colorimètre et en utilisant un écran

rouge à n° 70. Gruszewska et Roussel [73] modifient la méthode de Grigaut : le temps de contact entre l'alcool sodé et le sang est prolongé ; ils utilisent des tubes identiques en verre blanc, qu'ils laissent trente minutes à l'obscurité pour obtenir des teintes comparables ; ils opèrent un double dosage, l'un approximatif, l'autre plus précis servant de contrôle ; la comparaison des tubes colorés est faite avec une boîte à deux fentes, genre kaléidoscope. Machebœuf et Sandor, en 1933, [89] montrent que la méthode de Grigaut comporte des causes d'erreur ; le temps de contact est important, et la concentration optima en alcool de 60°. Grigaut, en 1935 [65], relève cette critique et montre que sa méthode atteint bien le degré d'alcool voulu.

D'autres méthodes de coloration ont été utilisées. Coquelet et Bigwood, en 1927 [32], utilisent la réaction furfurol-sulfurique, très sensible, qui leur donne les mêmes chiffres que la réaction de Liebermann et la méthode de Bloor ; de plus, ce dosage utilise de faibles quantités de sérum. Nikolaïeff et Krastelewsky proposent, en 1929, d'utiliser la réaction de Salkowsky, dans laquelle se forme un éther sulfurique du cholestérol, isolé par eux [109]. Doris Abramsohn [2] met au point ce procédé et obtient une phase colorée stable de 20 à 40 minutes.

La méthode par pesée, à la digitonine, semblerait préférable aux méthodes colorimétriques. Cependant, il faut noter que cette méthode réclame, pour avoir de bons résultats un minimum de 10 centimètres cubes de sérum par dosage. Windaüs, en 1910, donne la première méthode rigoureuse de dosage par la digitonine [150]. Celle-ci subit par la suite des modifications nombreuses. En 1920, Fex [48] introduit une amélioration qui permet d'extraire tout le cholestérol sous forme d'ester oléique ; ceci lui facilite le dosage du cholestérol libre et des esters. Lemeland, en 1921 et 1923 [85, 86, 87], apporte à son tour quelques modifications à la méthode de Windaüs, surtout au point de vue des extractions. Caminade [21], en 1922, rend la méthode de Windaüs vraiment quantitative en se

plaçant dans un milieu où le précipité de cholestérol-digitonine est rigoureusement insoluble : c'est le mélange eau-alcool-acétone. Toutes les méthodes ci-dessus utilisent 20 et 30 centimètres cubes de sérum ; elles sont donc peu pratiques pour des dosages comparatifs. Szent-Georgyi, en 1923 [137 et 138], donne une micro-méthode, permettant d'opérer sur de petites quantités de sang, et utilisant, soit une microbalance, soit l'oxydation par un mélange chromo-sulfurique ; il opère sur 1 centimètre cube de sang. Dam, en 1929 [35], conseille de laver le précipité avec une solution saturée de complexe digitonine-cholestérol ; il est préférable, en outre, d'établir les résultats d'après une courbe étalon dressée à l'avance, au lieu d'utiliser le coefficient fixé à 0,2431 ; de plus, la saponification rendrait le cholestérol en partie non précipitable par la digitonine. Ruth Okey, en 1931 [110], donne une autre méthode, basée sur l'oxydation du complexe digitonine-cholestérol par le bichromate de potasse dans un milieu spécial ; il fait remarquer lui aussi que la saponification rend le cholestérol inapte à se combiner à la digitonine. Yasuda, en 1932 [153], transforme la méthode d'Okey en microdosage ; il saponifie, comme Fex, les esters avec l'éthylate de sodium ; sa méthode donne cependant des chiffres inférieurs de 15 % à celle de Grigaut. Turner, en 1932 [139], simplifie la méthode de précipitation, en remplaçant les filtrations par des centrifugations, et en reprenant ensuite par la méthode d'Okey. Goffinet et Reding, en 1935 [59], dosent le cholestérol libre par la digitonine, d'après Caminade, après extraction à l'acétone ; comparant les diverses méthodes de Szent-Georgyi, Okey et Yasuda, ils en concluent que celles-ci sont hasardeuses et donnent des résultats incertains ; 20 centimètres cubes de sérum sont nécessaires, pour éviter les pertes par solubilité et apporter une précision suffisante. L'appliquant au cholestérol total [60], les mêmes auteurs extraient à l'acétone et rejettent les purifications de Kumagawa et de Lemeland, comme inutiles ; 10 centimètres cubes

de sérum, sont nécessaires d'après eux pour obtenir un bon résultat.

D'autres méthodes ont été encore préconisées. Surayi, en 1927 [135 et 136], titre le cholestérol par floculation à l'eau distillée, après extraction dans l'éther de pétrole, puis dans le xylol ; la méthode semble peu précise. Plus récemment, Charonnat, en 1935 et 1936 [24, 25, 26], est frappé par le fait que la soude extrait tout le cholestérol du sang ; il recherche les coefficients d'extractibilité de celui-ci, et en arrive, en étudiant les solvants, à conclure que seul le méthylal extrait 100 % du cholestérol ; l'oléate de soude permet également une extraction complète.

Séparation du cholestérol libre et estérifié. — Les premières méthodes utilisées sont celles de Windaùs [150] et de Caminade [21] à la digitonine, par pesée. Kumagawa [80], en 1908, utilise déjà la digitonine. Laudat et Grimbert [71] précipitent le cholestérol par la méthode de Windaùs. Ces méthodes sont longues et nécessitent de fortes quantités de sérum (20 cm^3). Grigaut, en 1933 [64] dose le cholestérol total et estérifié par colorimétrie, sur 2 centimètres cubes de sérum, en se débarrassant par précipitation du cholestérol libre avec la digitonine, dans le solvant E. A. C. de Caminade. Velluz [141], en 1933, dose également le cholestérol total et le cholestérol estérifié, par la méthode de Bloor, modifiée par lui, en précipitant le cholestérol libre par la digitonine.

Kanner avait proposé, en 1931 et 1933 [77 et 78], de doser le cholestérol libre par simple extraction à froid par l'éther de pétrole, sans précipitation ; le cholestérol libre serait seul et totalement dissous ; Grigaut [64] a montré que cette méthode n'avait rien d'absolu et qu'il y avait aussi dissolution d'une petite quantité de cholestérol estérifié.

Choix de notre méthode. — Hugounenq [75a], Guiart et Grimbert [74 a], Denigès [39 a], Labbé [81] préconisent la méthode de Grigaut, qui est la méthode courante. Derrien et Fontès [39 b] préfèrent les méthodes de Caminade et de

Szent-Georgyi. Labbé [81] préconise les méthodes de Caminade et de Bloor. Enfin, Neckludow et Chalatow, en 1931 [108], étudiant le rapport E/T, montrent que la méthode de Grigaut est peu sensible, donnant des écarts de 8 à 12 %; la méthode de Fex [48], d'après eux, serait la meilleure.

Nous avons vu que les méthodes à la digitonine utilisent d'importantes quantités de sérum, soit 20 et 30 centimètres cubes (Windaüs, Caminade, Fex, Laudat). De plus, des causes d'erreur nombreuses existent : solubilité du précipité (Caminade, Dam), variation de composition du complexe (Dam), inaptitude d'une partie du cholestérol obtenu par saponification à se combiner à la digitonine (Dam et Okey). Quant aux microméthodes de Szent-Georgyi, Okey et Yasuda, Goffinet et Reding ont montré leur incertitude. Enfin, si nous appliquions la méthode de Caminade sur 5 centimètres cubes de plasma, l'erreur relative de la pesée seule, avec une balance sensible au quart de milligramme, serait sur le cholestérol libre de 2,5 %, sur le cholestérol estérifié de 1,3 %, soit de 1,6 % sur le cholestérol total qui serait calculé dans ce cas ; en effet, nous aurions 0 gr. 00250 de cholestérol libre environ, donnant 0 gr. 01000 de précipité pesé à $\pm$ 0 gr. 00025 près. D'autre part, sur des précipités aussi faibles, le moindre incident, dans une technique déjà compliquée, produit des variations énormes, d'où de fortes erreurs. Nous verrons plus loin que le dosage par colorimétrie n'apporte que 1,4 % d'erreur.

La méthode de Grigaut n'est pas à utiliser ; les derniers travaux de Charonnnat [26] montrent que l'extraction est incomplète. La méthode de Bloor donne une bien meilleure extraction ; le mélange alcool-éther extrait la totalité des lipides ; de plus, celui-ci est porté à l'ébullition et l'alcool à 95°, à cette température, dissocie la substance A. 9 de Machebœuf. C'est donc la méthode de Bloor, modifiée par Velluz que nous utiliserons.

Méthode utilisée pour nos dosages

Nous avons choisi la méthode de Bloor, modifiée par Velluz pour la rendre applicable au dosage du rapport : cholestérol ester / cholestérol total [141]. Nous avons introduit quelques modifications légères, pour faciliter certaines mesures.

Principe. — Le premier temps de la méthode consiste en une désalbumination accompagnée d'extraction du cholestérol par un mélange d'alcool et d'éther. Le deuxième temps est constitué par le dosage du cholestérol total sur une partie du filtrat. Le troisième et dernier temps consiste à doser le cholestérol estérifié, après avoir éliminé le cholestérol libre par précipitation à la digitonine. Le cholestérol libre peut être calculé par différence.

Désalbumination. Extraction. — Dans une fiole jaugée de 100 centimètres cubes, bouchée émeri de préférence, on place 50 à 60 centimètres cubes d'un mélange alcool-éther, contenant pour 100 grammes, 75 grammes d'alcool à 95° et 25 grammes d'éther éthylique rectifié ; cette quantité de 50 à 60 centimètres cubes ne doit pas être dépassée, si on veut éviter toute perte au moment de l'ébullition. On y verse 5 centimètres cubes de plasma, exactement mesurés, goutte à goutte et en agitant. La fiole bouchée est immergée dans un bain-marie chaud, à 70 ou 80 ° C, et y est maintenue jusqu'à début d'ébullition du contenu. On refroidit immédiatement et soigneusement ; on complète à 100 centimètres cubes avec le mélange alcool-éther ; on agite et on filtre sur un petit filtre plissé, sur un entonnoir de 50 millimètres ; à la fin de la filtration le filtre est exprimé légèrement. Le filtrat a été recueilli dans une éprouvette de 100 centimètres cubes, bouchée émeri, graduée ou non ; on obtient ainsi de 92 à 95 centimètres cubes de filtrat. La perte par évaporation au moment de la filtration, est à peu près nulle, si

l'on opère dans une pièce à +15°. C'est sur ce filtrat que seront effectués les dosages.

Cholestérol total. — Dans un cristallisoir en verre mince, de 80 millimètres de diamètre, on évapore d'abord à l'air, puis au bain-marie tiède, 25 centimètres cubes exactement mesurés du filtrat précédent. Ces 25 centimètres cubes correspondent à 1 cm³ 25 de plasma. Le résidu est repris à cinq reprises successives, par 1 centimètre cube environ de chloroforme rectifié incolore. Nous utilisons pour le dosage un cholestérimètre de Grigaut, formé de plusieurs tubes en verre blanc, bouchés émeri, et gradués en cinquièmes de centimètre cube, de 0 à 20 centimètres cubes ; nous avons vérifié au préalable que les graduations de ces tubes sont exactes et se correspondent entre elles. La solution chloroformique du résidu est amenée à correspondre exactement au trait de 5 centimètres cubes de l'un des tubes ; jusqu'au trait de 7 centimètres cubes, on ajoute ensuite 2 centimètres cubes d'anhydride acétique pur Poulenc ; et, ensuite cinq gouttes d'acide sulfurique pur bouilli Poulenc R. P., d = 1,84 ; ces gouttes sont mesurées toujours avec le même compte-goutte normal ; nous obtenons ainsi un volume final de 7 cm³ 1. Dans un tube identique, nous traitons 5 centimètres cubes de solution étalon, exactement de la même manière. Les tubes, bouchés, sont placés aussitôt en chambre noire, pendant une demi-heure.

La solution étalon se prépare de la manière suivante : nous admettrons dans le plasma un taux normal de cholestérol total de 1 gr. 50. Par suite des dilutions successives, nous sommes amenés à faire une solution contenant par litre : $1 \text{ gr. } 50 \times \frac{5}{1.000} \times \frac{25}{100} \times \frac{1.000}{5} = 0 \text{ g. } 375$ de cholestérol. Nous pesons très exactement, au quart de milligramme, 0gr. 375 de cholestérol; ceux-ci sont dissous dans 100 centimètres cubes de chloroforme rectifié, à +15° C, dans un flacon jaugé bouché émeri ; 25 centimètres cubes de cette première solution sont amenés ensuite à 250 centimètres

cubes à l'aide de chloroforme, dans un flacon jaugé de 250 centimètres cubes bouché émeri, et à + 15° C. Cette solution diluée constitue notre solution étalon, que nous conserverons dans un flacon en verre jaune, bouché émeri, à l'abri de la lumière.

Après 30 minutes de repos exactement, en chambre noire, les deux tubes précédents sont comparés, en les plaçant devant un écran, constitué par un verre dépoli éclairé indirectement par la lumière du jour ; cette disposition permet de saisir facilement les différences de tonalité, si légères soient-elles. Nous opérons alors notre dilution avec du chloroforme et voici pourquoi : la technique classique de Grigaut exige pour la dilution, l'emploi d'une solution chloroformique d'anhydride acétique et d'acide sulfurique dans les mêmes proportions qu'à la coloration ; l'anhydride acétique a l'inconvénient de rendre la manipulation très pénible, au moment de la comparaison ; nous avons songé à examiner si la dilution par le chloroforme pur pouvait modifier les teintes obtenues ; dans ce but, nous avons fait des expériences comparatives sur un même sang, en effectuant d'une part dans deux tubes une dilution avec du chloroforme pur, et d'autre part dans deux autres tubes, une dilution avec du chloroforme contenant l'anhydride acétique et l'acide sulfurique ; les résultats obtenus montrent qu'il n'y a aucune modification de teinte :

	Dilution au chloroforme		Dilution au mélange de grigaut	
Sang n° 1, en centimètres cubes	7,8	7,9	8,0	7,9
Sans n° 2, en centimètres cubes	8,5	8,4	8,4	8,4
Sang n° 3, en centimètres cubes	11,3	11,2	11,1	11,2

Etant donné que l'on ne peut apprécier, avec une habitude suffisante les différences de coloration qu'à un dixième de centimètre cube près, ces chiffres peuvent être considérés comme identiques. Le chloroforme, pour la dilution sera ajouté lentement par dixième de centimètre cube, à l'aide d'une pipette de 1 centimètre cube, graduée en dixiè-

mes, jusqu'à égalité de teinte entre les deux liquides.

Le volume initial dans les deux tubes était de 7cm³1. Nous avons deux dilutions possibles :

soit dilution de la solution à doser :

$$1 \text{ g. } 50 \times \frac{n}{7,1} = 0 \text{ g. } 211 \times n \text{ cholestérol par litre de plasma}$$

soit dilution de la solution étalon :

$$1 \text{ g. } 50 \times \frac{7,1}{n'} = \frac{10,65}{n'} \text{ g. de cholestérol par litre de plasma.}$$

Cholestérol estérifié. — 50 centimètres cubes du filtrat précédent de désalbumination, correspondant à 2cm³5 de plasma, sont concentrés au bain-marie tiède jusqu'à 20 centimètres cubes dans un cristallisoir en verre mince de 80 millimètres ; à ce moment, on fait couler le long des parois 2 centimètres cubes d'une solution de digitonine Poulenc R. P. à 1 % dans l'alcool absolu ; on laisse ensuite évaporer jusqu'à siccité, mais en évitant toute surchauffe du résidu. La quantité de solution de digitonine ajoutée est en excès suffisant, si le taux de cholestérol total n'atteint pas 2 gr. 50, pour précipiter et insolubiliser tout le cholestérol libre ; au-delà de 2 gr. 50, il y a lieu d'augmenter la quantité de digitonine proportionnellement à celle du cholestérol total.

Le résidu obtenu est épuisé à quatre reprises successives par chaque fois 5 centimètres cubes d'éther de pétrole bouillant (P. E. 50°-60°), en triturant le résidu avec un agitateur fin ; l'éther de pétrole bouillant dissout les éthers du cholestérol, sans dissoudre ni décomposer le complexe cholestérol+digitonine (Grigaut [64]). L'éther de pétrole est filtré sur un petit filtre, sur un entonnoir de 20 à 25 millimètres, et est recueilli dans un petit cristallisoir, de 50 millimètres. L'éther de pétrole est abandonné à l'évaporation d'abord à l'air libre, puis au bain-marie tiède, en évitant toute surchauffe du résidu sec. Le résidu est alors repris

par le chloroforme, et le dosage continue comme pour le cholestérol total.

La solution étalon n'est pas cependant la même que celle qui sert au dosage du cholestérol total. Nous admettrons qu'il y a environ par litre de plasma 1 gramme de cholestérol estérifié. La solution type devra donc contenir par litre, par suite des dilutions successives :

$$1 \text{ gr.} \times \frac{5}{1.000} \times \frac{50}{100} \times \frac{1.000}{5} = 0 \text{ gr.}50 \text{ de cholestérol.}$$

Cette solution sera préparée de la même manière que la première citée, mais à 0 gr. 50 par litre.

Le volume initial dans les deux tubes sera aussi de 7cm³1. Nous aurons deux dilutions possibles :

soit celle du tube de solution à doser :

$$1 \text{ gr.} \times \frac{n}{7,1} = 0 \text{gr.}141 \text{ de cholestérol ester par litre de plasma}$$

soit celle du tube de solution étalon :

$$1 \text{ gr.} \times \frac{7,1}{n'} = \frac{7 \text{ gr.}1}{n'} \text{ de cholestérol ester par litre de plasma.}$$

Cholestérol libre. — Le cholestérol libre n'est pas dosé par cette méthode ; il ne peut que s'évaluer par le calcul, en faisant la différence entre le cholestérol total et le cholestérol estérifié. Nous admettrons comme taux normal 0 gr. 50.

Approximation de notre méthode. — On arrive fort bien avec un peu d'habitude à apprécier, en se plaçant dans les conditions que nous avons indiquées, des différences de coloration, sensibles jusqu'à un dixième de centimètre cube.

Nous avons admis comme chiffres normaux, 1 gr. 50 de cholestérol total, 1 gramme de cholestérol estérifié et 0 gr. 50 de cholestérol libre.

Un dixième de centimètre cube correspond à 0 gr. 0211

de cholestérol total, d'où une erreur absolue de 0 gr. 0211 sur 1 gr. 50, ce qui nous donne 1,4 % d'erreur relative sur le cholestérol total.

Un dixième de centimètre cube donne 0 gr. 014 de cholestérol estérifié, d'où 0 gr. 014 d'erreur absolue sur 1 gramme, et par suite : 1,4 % d'erreur relative sur le cholestérol estérifié.

Dans le calcul du cholestérol libre, les erreurs absolues du cholestérol total et estérifié s'ajoutent, soit 0,0211 + 0,104 = 0,0351, ce qui donne 0 gr. 0351 d'erreur absolue pour 0 gr. 50, d'où une erreur relative de 7 % sur le cholestérol libre.

Dans le calcul des rapports E/T et E'/T', les erreurs relatives sur le cholestérol total et sur le cholestérol estérifié s'ajoutent, ce qui nous donne : 2,8 % d'erreur relative.

Détermination du pouvoir cholestérolytique

Critique des méthodes. — La première méthode, utilisée par Decourt et Lœper [36] était basée sur la floculation ; elle n'est qu'approximative et ne donne pas de résultats précis.

Lœper, Lemaire et Lesure [91] mettent ensuite en présence de cholestérol, le sérum sanguin, placé pendant 48 heures à l'étuve à 37°.

Eck et Desbordes utilisent la même méthode, et rapportent leurs résultats à cent, pour obtenir un indice plus général et plus comparable.

Edgard Rosa a défini en 1935 [47] la détermination du pouvoir cholestérolytique ; le sérum est mis à l'étuve à 37° C, pendant 48 à 72 heures, en présence de 0 gr. 02 de cholestérol pulvérisé par centimètre cube de sérum. La différence obtenue entre le dosage du cholestérol après chauffage et celui avant chauffage, est ramené à cent, et affecté du signe + dans le cas de dissolution et du signe — dans le cas de précipitation.

Méthode choisie. — Tous les auteurs parlent de filtration du sérum pour se débarrasser du cholestérol après chauffage. Cette filtration est très délicate, comme nous avons pu nous en rendre compte ; elle amène des pertes, soit par évaporation, soit par imbibition des filtres ; de plus, elle est fort longue et toutes les manières de filtration se révèlent à l'usage aussi mauvaises les unes que les autres. Nous avons donc pensé, pour parer à cet ennui, à remplacer la filtration par la centrifugation.

Dans un tube à centrifuger conique et stérile, de 30 centimètres cubes, nous plaçons 0 gr. 14 de cholestérol pur cristalisé et pulvérisé ; nous ajoutons 7 centimètres cubes de plasma oxalaté ; nous divisons le cholestérol avec un agitateur fin ; et nous bouchons le tube avec un bouchon de liège également stérile.

Dans un deuxième tube, identique au premier, nous plaçons 7 centimètres cubes de plasma sans toutefois l'additionner de cholestérol ; nous bouchons de la même manière. Ce tube nous servira de témoin.

Les deux tubes sont mis à l'étuve à température constante, réglée à +37° C, On les y laisse pendant 48 heures en agitant de temps à autre. Après ce laps de temps, à régler aussi exactement que possible (48 heures étant la durée optima [102]), les deux tubes sont retirés de l'étuve et soumis à la centrifugation, à 6.000 tours, pendant 10 minutes. Après celle-ci le plasma clair que l'on obtient est décanté, on en prélève 5 centimètres cubes exactement mesurés sur lesquels sont effectués les dosages de cholestérol.

Si nous appelons a la teneur en cholestérol total du plasma chauffé sans cholestérol, et b celle du plasma chauffé en présence de cholestérol, le pouvoir cholestérolytique total x est donné en valeur et en signe par : $x = \frac{b-a}{a} \times 100$.

Si a' est la teneur en cholestérol ester du plasma chauffé sans cholestérol, b' celle du plasma chauffé en présence de

cholestérol, le pouvoir cholestérolytique x' des esters est donné en valeur et en signe par :

$$x' = \frac{b' - a'}{a'} \times 100.$$

Si a'' est la teneur en cholestérol libre du plasma chauffé sans cholestérol, b'' celle du plasma chauffé en présence de cholestérol, le pouvoir cholestérolytique libre x'' sera donné. en valeur et en signe par :

$$x'' = \frac{b'' - a''}{a''} \times 100.$$

Approximation des résultats. — Pour obtenir une plus grande précision dans la détermination du pouvoir cholestérolytique et comparer nos résultats entre eux, tous les dosages de cholestérol total ou de cholestérol ester concernant le même échantillon de sang, ont été effectués en même temps, comparativement entre eux et par rapport au même tube étalon. C'est là ce qui nous permet de dire que l'erreur sur le dosage du cholestérol total ou sur celui des esters ne dépasse pas 1,4 % d'erreur relative.

L'erreur relative commise sur le pouvoir cholestérolytique total x, ne sera donc pas supérieure à trois fois l'erreur relative sur le dosage du cholestérol ; elle sera au maximum de 4,2 %.

De même, l'erreur relative sur le pouvoir cholestérolytique ester x' ne sera pas supérieure à 4,2 %.

Par contre, le cholestérol libre étant évalué par différence et grevé d'une erreur relative de 7 %, le pouvoir cholestérolytique libre x'' aura comme limite supérieure d'erreur relative trois fois 7 ou 21 %. Un pouvoir x'' évalué à + 10 %, sera donc en réalité compris entre + 8 et + 12% L'erreur relative sur le pouvoir x'' est par conséquent très élevée.

CHAPITRE VI

LE DOSAGE DES PROTÉIDES

De nombreuses méthodes ont été utilisées pour doser les protéides et le rapport : sérine / globuline. Nous allons les passer d'abord en revue, afin de choisir celle qui nous paraîtra la meilleure pour notre étude.

Etude critique des méthodes de dosage

Les méthodes utilisées se groupent en plusieurs classes différentes : méthodes basées sur l'action de la chaleur, méthodes physiques, méthodes utilisant l'action précipitante des sels, de l'alcool, de l'acétone.

Méthodes utilisant la chaleur ou l'oxydation. — Guiart [74 a] recommande la méthode de précipitation par la chaleur, en milieu acétique et dilué ; cette méthode, relativement précise, est la plus classique. Barral [9 a] recommande la même méthode, qui utilise cependant une trop grande quantité de sérum. Denigrès [39 a] emploie la méthode de Myttenœre et Bessemans, dosant les protéides totales par la chaleur et la globuline par le gaz carbonique ; elle a le tort d'être relativement longue. Labbé [81] cite Wu, qui, en 1922 [151], a indiqué une méthode de dosage colorimétrique : celle-ci est peu précise. Les méthodes par oxydation sont plus nombreuses. En 1922, Polonowsky [120] dose les substances réductrices du sang par l'oxydation chromique ; il obtient un indice chromique relatif aux protéides. En 1925, Wùnschendorff [152] imagine de doser les

protéides indirectement par oxydation ; ceci paraît peu précis. En 1929, Boulanger [14 b] dose les protéides par permanganimétrie ; la méthode est peu précise ; l'auteur lui accorde de 5 à 10 % d'erreur. En 1931, Boulanger et Warenbourg [15] dosent les protéides totales sur 1 centimètre cube de sérum par le permanganate et le bichromate; le bichromate permettrait de donner des chiffres exacts à 1 gramme près. Polonowsky, Warembourg et Cuvelier [122] opèrent sur 0cm³1 de sérum un dosage sulfochromique, qui serait précis. En 1933, Polonowsky, Boulanger et Warembourg [121] dosent les protéides totales et le rapport sérine / globuline, par oxydation, après délipidation par l'acétone. Malgré leurs avantages de simplicité, ces méthodes semblent peu précises, beaucoup d'éléments réducteurs pouvant agir, tels que le glutathion. En 1932, Boutroux [16] dose les protéides totales par oxydation sulfochromique, mais reconnaît que le dosage séparé de la sérine et de la globuline est impossible par ce procédé. La méthode par oxydation ne paraît pas atteindre, d'après les auteurs eux-mêmes, un degré de précision suffisant.

Méthodes physiques. — Labbé [81] signale diverses méthodes, telles celle de Hammerschlag par densimétrie, celle de Reiss par néphélométrie ; celles de Starling, de Krogh et de Gowaerts par tensioosmométrie ; l'auteur les classe comme peu précises et incertaines. En 1930, Achard, Grigaut et Coudounis [4] étudient la méthode réfractométrique ; celle-ci donne des résultats très inexacts. En 1930, Avellar de Loureiro [9] étudie les méthodes néphélémétriques de Rusznyak [130] et de Rona et Kleinmann [127] ; il conclut que celles-ci et toutes les autres donnent des résultats très inconstants. Les méthodes physiques ne semblent pas à recommander.

Méthodes aux sels. — La méthode de Hofmeister, au sulfate d'ammoniaque, citée par Labbé [81], est la première en date; relativement exacte, elle utilise de grandes quantités de sérum. La méthode de Howe [75] est utilisée

par Derrien et Fontès [39 b], Guiart [74 a], Barral [9 a], Labbé [81] ; Labbé fait remarquer que la précipitation par le sulfate de soude de Howe est tout à fait théorique et critiquable ; elle utilise de fortes quantités de sérum ; d'autre part, le dosage par minéralisation donne lieu à des erreurs ; en effet, le coefficient est de 6,50 pour la sérine et de 6,25 à 6,95 pour la globuline suivant les auteurs ; de plus, la méthode est longue et complexe. La méthode de Kayser est la meilleure [79 a] ; elle précipite par l'alcool-acétone les protéides totales et les globulines par le sulfate de magnésie ; elle utilise cependant 15 centimètres cubes de sérum, quantité trop importante. Elle peut subir la même critique que Labbé fait à celle de Howe ; la précipitation de la globuline est toute théorique ; la méthode de Kayser donne cependant de bons résultats ; son seul tort est de nécessiter de trop grandes quantités de sérum.

Précipitation par l'alcool. — En 1930, Grigaut, Boutroux et Coudounis [66] précipitent les protéides par l'alcool à 95° ; ce dosage serait le meilleur et le plus précis. En 1936, Roche [126] précipite les protéides par l'alcool ; il obtient de bons résultats, mais dose les globulines par minéralisation Kjehldahl, ce qui est long.

Précipitation par l'acétone. — Piettre et Villa [119] donnent la première méthode à l'acétone, en opérant en chambre froide, à 0° environ. En 1932, Bierry et Moquet [10] donnent une méthode rapide précipitant les protéides totales par l'acétone. Piettre, en 1926 [118] met au point sa méthode et la signale comme rapide et précise. En 1931, Arcand [6 et 7] démontre que la méthode de Kayser et celle de Howe ne donnent pas de meilleurs résultats que celle de Piettre ; il conseille d'employer celle-ci de préférence parce que plus pratique. Enfin, Merklen, Le Breton et Adnot [101] rendent cette méthode très pratique et très exacte, comparativement aux autres méthodes ; ils utilisent la centrifugation et opèrent sur 1 centimètre cube de

sérum, qui sert à doser à la fois les protéides totales et les globulines.

Choix de la méthode. — Nous étions obligés de rechercher une méthode rapide, simple, exacte et utilisant le minimum de sérum sanguin. Les méthodes par la chaleur demandent trop de sérum ; les méthodes par oxydation également ; de plus, elles ne permettent pas de doser le rapport sérine/globuline, et la méthode par oxydation est incertaine. Les méthodes physiques n'apportent pas toutes une très grande précision. Parmi les méthodes aux sels, seule celle de Kayser serait pratique et exacte, mais elle utilise trop de sérum. Les méthodes par précipitation à l'alcool ne sont pas encore au point ; elles paraissent abandonnées à l'heure actuelle. La méthode la plus précise en ce moment est celle de Piettre par précipitation à l'acétone ; nous avons utilisé celle-ci, telle qu'elle est décrite par Merklen et ses collaborateurs ; nous l'avons légèrement modifiée, au point de vue du séchage des précipités.

Méthode utilisée dans notre travail

La méthode de Merklen, Le Breton et Adnot [101] dérive de celle de Piettre ; nous l'avons un peu modifiée, en ce qui concerne la prise d'essai et le séchage du précipité.

Principe. — La méthode se divise en deux temps. Le premier consiste à précipiter les protéides totales par l'acétone, à une température aussi basse que possible et à peser ce précipité une fois desséché. Le deuxième temps est marqué par la redissolution des protéides dans l'eau distillée, et la précipitation de la globuline au moyen du gaz carbonique.

Protéides totales. — Dans un tube de centrifugeuse, bouché par un capuchon métallique à vis et taré, en verre pyrex, nous faisons couler 3 centimètres cubes de sérum, exactement mesurés, et obtenus après coagulation de la

fibrine dans le plasma à l'aide de chlorure de calcium. On refroidit en plaçant le sérum à la glacière aux environs de 0°. On ajoute 3 centimètres cubes d'eau bidistillée récente, rigoureusement neutre, et glacée, puis peu à peu et en agitant, 24 centimètres cubes d'acétone pure Poulenc glacée par le séjour à la glacière. On centrifuge 30 secondes à 2.000 tours. L'acétone est décantée et recueillie en vue de sa récupération. Le précipité d'albumines est redissous dans 6 centimètres cubes d'eau bidistillée glacée, en s'aidant d'un agitateur et en ajoutant l'eau par très petites quantités surtout au début. On ajoute de nouveau 30 centimètres cubes d'acétone glacée, pour reprécipiter et délipider à fond. On centrifuge une deuxième fois ; on décante l'acétone. Le précipité de protéides est repris par 6 centimètres cubes d'eau bidistillée glacée, additionnés d'une goutte de solution de chlorure de sodium à 1 % dans l'eau bidistillée, et reprécipité de nouveau une troisième fois par 30 centimètres cubes d'acétone glacée. On centrifuge de nouveau 30 secondes à 2.000 tours, et on décante. Ce précipité est séché à 100° par Merklen ; ce séchage rend très difficile la reprise ultérieure du précipité par l'eau et sa solubilisation. Nous avons donc opéré de la manière suivante : le précipité de protéides est repris par 3 centimètres cubes d'eau bidistillée glacée, puis additionné de 30 centimètres cubes d'alcool à 95° glacé. On centrifuge de nouveau, une minute, à 3.000 tours. L'alcool limpide est décanté. Enfin, le précipité est repris par 30 centimètres cubes d'éther éthylique pur glacé, en le délayant soigneusement avec un agitateur. On centrifuge 30 secondes à 1.000 tours. L'éther est décanté ; le tube, contenant le précipité est placé dans un exsiccateur de Chancel, dans lequel se trouve déjà de l'acide sulfurique pur Poulenc à 66° B°. A l'aide d'une trompe à eau, on soumet le tube au vide sulfurique pendant une heure ; après ce temps, le bloc de protéides est suffisamment sec pour être pulvérisé dans le tube taré, à l'aide d'un agitateur. Après cette pulvérisation grossière, le tube est replacé dans l'exsiccateur ; on

fait dans celui-ci un vide très poussé, à l'aide d'une machine pneumatique. Ce vide est maintenu de 15 à 18 heures, pour enlever les dernières traces d'humidité. Après ce temps, deux pesées successives, faites à une heure d'intervalle ne donnent pas une différence supérieure à un miligramme, sur les 230 milligrammes environ de précipité obtenus. Il est nécesseire de boucher le tube avec son capuchon pendant la pesée, le précipité de protéides étant très hygroscopique. On obtient ainsi une augmentation de poids P du tube taré, qui représente le poids du précipité, d'où les protéides totales pour un litre de sérum :

$$P \times \frac{1.000}{3}$$

On obtient des albumines très blanches, pulvérulentes, sans aucune altération.

Dosage de la globuline. — Le précipité de protéides totales est redissous dans 30 centimètres d'eau bidistillée glacée, en s'aidant d'un agitateur et en ajoutant l'eau par très petites quantités, surtout au début. Le précipité se redissout facilement ; on obtient une solution lactescente de protéides. Cette dissolution serait très difficile, si l'on avait séché les protéides à 100°. Pendant 10 minutes, on fait passer dans cette solution un courant de gaz carbonique, préparé à l'aide de carbonate de calcium et d'acide sulfurique pur au demi, en fines bulles, à raison d'une bulle par seconde ; la solution se sature peu à peu de gaz carbonique, et le pH de 5,5 se réalise automatiquement, permettant la précipitation des globulines seules ; ce procédé par le gaz carbonique était déjà utilisé dans la méthode de Myttenœre et Bessemans, citée par Denigès [39 a, p. 600]. Toute la globuline est ainsi précipitée, la sérine restant dissoute. On centrifuge 2 minutes, à 3.000 tours. la solution de sérine est décantée et rejetée. Le précipité de globuline est repris par 3 centimètres cubes d'eau, puis 30 centimètres cubes d'alcool à 95° et le séchage est poursuivi, comme pour les protéides totales.

On obtient un poids p de précipité, ce qui donne : $p \times \frac{1.000,}{3}$ de globulines par litre de sérum.

Pendant le passage du courant de gaz carbonique, des mousses se produisent ; une trace d'alcool iso-amylique suffit, en surface, à arrêter celles-ci.

Evaluation de la sérine. — La sérine est évaluée par calcul, en faisant la différence entre les protéides totales et les globulines. Cependant, le dosage de la sérine peut être effectué, pour contrôle, sur la solution de sérine obtenue pendant la précipitation de la globuline, par une méthode quelconque de chauffage.

Approximation de la méthode. — Le taux de protéides totales est en moyenne de 76 grammes par litre, soit 45 grammes de sérine et 31 grammes de globuline, d'après Barral [9 a] ; la valeur théorique du rapport S/G est ainsi de 1,4 à 1,5 ; Barral donne pour valeur normale du rapport 1,4 (Patein et Roux) et 1,08 à 1,49 (Achard et Grigaut) ; la saignée provoque l'augmentation, puis la diminution du rapport S/G. Labbé [81], citant divers auteurs, donne comme chiffre normal pour les protéides totales de 73,5 à 84,8 par litre, et pour le rapport S/G, de 1,37 à 1,96. Nous admettrons donc comme rapport normal, de 1,08 à 1,96, et comme taux de protéides, de 73,5 à 84,8. Le rapport S/G est abaissé dans presque tous les cas pathologiques.

Les précipités sont pesés au quart de milligramme. L'erreur absolue est de $\pm$ 0gr. 00025, sur 228 milligrammes (3 fois 76 milligrames, en théorie), de protéides totales ; l'erreur relative est donc de $\pm$ 0,11 %. Sur les globulines, même erreur absolue, mais sur 93 milligrammes (3 fois 31), de précipité, soit une erreur relative de $\pm$0,27 %.

La sérine est obtenue par différence. Ceci donne une erreur absolue de 0 gr. 0005, sur 135 milligrammes (3 fois 45) soit une erreur relative de$\pm$ 0,37 %.

L'erreur relative commise sur le rapport sérine / globuline, sera donc : $\pm$ 0,27$\pm$0,37 = $\pm$0,64 %.

TABLEAU N° I — Résultats expérimentaux

DOSAGES	Erreur relat. %	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
Plasma non chauffé (cholest. total	1.4	3.03	1.72	2.87	1.80	1.98	1.69	1.50	1.54	1.52	1.50	1.50	1.75	1.66	2.06	1.60	1.50	1.73	1.56	1.98	1.16	1.21	1.38	1.21	1.50	1.86	1.33	1.37	1.37	1.40	1.67	1.50	1.05	1.50	1.86	1.60
Plasma non chauffé (cholest. ester	1.4	1.74	1.20	2.09	0.96	0.70	0.96	0.53	0.79	0.92	1.11	0.77	1.20	1.13	1.06	0.89	0.50	1.00	0.89	0.93	0.65	0.62	0.79	0.63	0.78	0.81	0.65	0.65	0.38	0.81	1.02	0.68	0.43	0.56	0.86	0.48
Plasma chauffé sans chol. (cholest. total	1.4	2.94	1.74	2.79	1.83	1.93	*	1.50	1.54	1.52	*	1.50	1.75	1.66	2.06	1.60	1.50	1.73	*	1.98	1.16	*	1.38	1.21	1.50	1.86	1.33	1.27	1.37	1.40	*	1.50	*	1.50	1.86	1.60
Plasma chauffé sans chol. (cholest. ester	1.4	1.75	1.32	1.83	0.50	0.70	*	0.53	1.06	1.16	*	0.77	1.20	1.29	1.20	1.15	0.73	1.00	*	0.93	0.46	*	0.83	0.73	0.93	1.06	0.65	0.68	0.79	0.97	*	*	*	0.54	0.60	0.70
Plasma chauffé avec chol. (cholest. total	1.4	1.54	1.78	2.83	2.12	2.06	1.82	1.41	1.50	1.65	1.84	1.60	1.75	1.50	2.35	1.60	1.66	1.94	1.36	1.98	1.33	1.38	1.44	0.98	1.77	2.11	1.40	1.29	1.50	1.69	1.77	1.50	1.12	1.50	1.86	1.69
Plasma chauffé avec chol. (cholest. ester	1.4	0.72	1.01	1.26	0.60	0.70	1.01	0.66	1.08	1.08	1.11	0.77	1.32	1.00	1.04	1.06	0.83	1.04	0.37	0.91	0.62	0.71	0.81	0.56	0.91	1.16	0.67	0.62	0.79	0.97	1.06	0.85	0.41	0.62	0.83	0.86
Sérum non chauffé (Protéides tot.	0.11	*	73.9	*	81.0	66.0	85.8	75.7	76.8	63.5	73.8	76.8	77.8	73.2	89.7	74.7	79.6	75.4	70.6	71.8	76.2	70.3	75.2	72.7	75.4	74.5	72.3	79.2	87.2	76.2	79.0	80.8	85.7	74.3	77.9	87.0
Sérum non chauffé (Globulines.....	0.27	*	25.3	*	*	*	41.0	32.2	48.2	21.1	34.8	35.3	36.2	41.3	63.0	48.3	51.1	47.0	41.4	51.7 0	41.5	34.3	34.3	33.8	39.8	36.5	38.5	41.7	50.3	35.5	47.7	49.5	54.7	44.4	30.1	31.0
Cas observés			Néphrite.	Arthrite.	Néphrite.	Ictère.	Ictère.	Foie hypertrophié.	Ictère.	Arthrite.	Subictère.	Ictère.	Syphilis.	Syphilis.	Œdème.	Rougeole.	Rougeole.	Cirrhose.	Cirrhose.	Adénite.	Cirrhose.	Cirrhose.	Normal.	Psoriasis.	Normal.	Ictère.	Ictère.	Pyodermite.	Sycosis.	Adénite.	Normal.	Rhumatisme.	Arthrite, Rhumatisme,	Tuberculose.	Oreillons.	Troubles hépatiques.	Troubles gastriques.

TABLEAU N° II — Résultats calculés

RÉSULTATS	Erreur relat. %	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
Plasma non chauffé (Rapport E/T	2.8	0.57	0.75	0.73	0.64	0.35	0.57	0.35	0.51	0.61	0.74	0.51	0.69	0.68	0.52	0.56	0.33	0.58	0.57	0.47	0.56	0.51	0.57	0.52	0.52	0.44	0.49	0.47	0.28	0.58	0.61	0.45	0.41	0.37	0.46	0.30
Plasma chauffé sans cholestérol (Cholestérol libre	7	1.19	0.42	0.96	1.33	1.23	*	0.97	0.48	0.36	*	0.73	0.55	0.37	0.86	0.45	0.77	0.73	*	1.05	0.70	*	0.55	0.48	0.57	0.80	0.68	0.59	0.58	0.43	*	*	*	0.96	1.26	0.90
Plasma chauffé sans cholestérol (Rapport E''/T''.....	2.8	0.59	0.76	0.66	0.27	0.36	*	0.35	0.69	0.76	*	0.51	0.69	0.78	0.58	0.72	0.49	0.58	*	0.47	0.40	*	0.60	0.60	0.62	0.57	0.49	0.54	0.58	0.69	*	*	*	0.36	0.32	0.44
Plasma chauffé avec cholestérol (Cholestérol libre	7	0.82	0.77	1.57	1.52	1.36	0.81	0.75	0.42	0.57	0.73	0.83	0.43	0.50	1.31	0.54	0.83	0.90	0.99	1.07	0.71	0.67	0.63	0.42	0.86	0.95	0.73	0.67	0.71	0.72	0.71	0.65	0.71	0.88	1.03	0.83
Plasma chauffé avec cholestérol (Rapport E'/T'	2.8	0.47	0.57	0.45	0.28	0.34	0.56	0.47	0.72	0.65	0.60	0.48	0.75	0.67	0.44	0.66	0.50	0.54	0.27	0.46	0.47	0.51	0.56	0.57	0.51	0.55	0.48	0.48	0.53	0.57	0.59	0.57	0.37	0.41	0.45	0.51
Pouvoir cholestérolytique total x	4.2	—49	+3.5	—1.4	+18	+4	+7.7	—6	—2.7	+8.6	+23	+6.6	0	—10	+14	0	+11	+12	—13	0	+15	+14	+4.4	—19	+18	+13	+5.2	—5.8	+9.5	+21	+6	0	+6.7	0	0	+5.6
Pouvoir cholestérolytique ester x'.....	4.2	—59	—23	—31	+20	0	*	+25	+1.9	—6.9	*	0	+10	—22	—13	—7.8	± 14	+4	*	—2.2	+35	*	—2.4	—23	—2.2	+9.5	+3.1	—8.9	0	0	*	*	*	+15	—38	+23
Pouvoir cholestérolytique libre x''	21	—31	+83	+64	+16	+11	*	—23	-12.5	+58	*	+14	—22	+35	+52	+20	+7.8	+23	*	+1.9	+1.4	*	+15	-12.5	+51	+19	+7.4	+14	+22	+67	*	*	*	—8.4	—18	—7.8
Sérum non chauffé (Sérine.....	9.37	*	48.6	*	*	*	44.8	43.5	28.7	42.3	39.0	41.5	41.6	31.9	26.7	36.4	28.5	28.4	29.2	20.1	34.7	36	40.9	38.9	35.6	38.0	33.8	37.5	36.9	40.7	31.3	31.3	31.0	29.9	47.8	56.0
Sérum non chauffé (Rapport sérine-glob..	7.64	*	1.92	*	*	*	1.09	1.35	0.59	2.00	1.12	1.18	1.15	0.77	0.42	0.75	0.56	0.60	0.71	0.39	0.84	1.05	1.19	1.15	0.90	1.04	0.88	0.90	0.73	1.15	0.66	0.63	0.57	0.67	1.59	1.80
Cas observés			Néphrite.	Arthrite.	Néphrite.	Ictère.	Ictère.	Foie hypertrophié.	Ictère.	Arthrite.	Subictère.	Ictère.	Syphilis.	Syphilis.	Œdème.	Rougeole.	Rougeole.	Cirrhose.	Cirrhose.	Adénite.	Cirrhose.	Cirrhose.	Normal.	Psoriasis.	Normal.	Ictère.	Ictère.	Pyodermite.	Sycosis.	Adénite.	Normal.	Rhumatisme.	Rhumatisme, Arthrite.	Tuberculose.	Oreillons.	Troubles hépatiques.	Troubles gastriques.

CHAPITRE VII

RESULTATS TIRÉS DE NOTRE TRAVAIL

Nos recherches ont porté sur trente-cinq sujets différents. Nous avons effectué sur le plasma de ceux-ci, tous les dosages que nous avions prévus dans notre chapitre IV ; certains d'entre eux, malheureusement, par suite de l'insuffisance du plasma, n'ont pas pu être absolument complets.

Nous avons classé nos résultats en deux catégories. Dans un premier tableau, nous avons inscrit tous les chiffres purement expérimentaux, résultant directement de nos dosages ; ces résultats sont au nombre de huit, ce sont :

1° Dans le plasma non chauffé, les taux de cholestérol total et de cholestérol ester, évalués en grammes par litre ;

2° Les taux correspondant dans le plasma chauffé, sans cholestérol.

3° Les résultats obtenus dans le plasma chauffé en présence de cholestérol ;

4° Dans le sérum non chauffé, les taux de protéides totales et de la globuline, évalués en grammes par litre. De plus, en regard des quantités trouvées, nous avons marqué dans ce tableau l'erreur relative commise dans chaque dosage (voit tableau I).

Dans un deuxième tableau, ont été classés tous les résultats calculés à l'aide des chiffres d'expérience contenus dans le tableau I. Dans le tableau II, les résultats suivants ont été portés :

1° Dans le plasma non chauffé, le rapport : cholestérol ester / cholestérol total, désigné par E/T ;

2° Dans le plasma chauffé sans cholestérol, le taux de cholestérol libre, évalué par différence en grammes par litre, et le rapport cholestérol ester/cholestérol total, désigné par E''/T''.

3° Dans le plasma chauffé avec cholestérol, le cholestérol libre, évalué par différence, en grammes par litre, et le rapport cholestérol ester / cholestérol total, désigné par E'/T'.

4° Les pouvoirs cholestérolytiques total x, ester x' et libre x'' ; ceux-ci ont été calculés à l'aide des taux de cholestérol du plasma chauffé sans cholestérol ; en effet, nous verrons plus loin que le chauffage modifie la répartition du cholestérol ; il était donc plus logique de prendre pour chiffes initiaux ceux du plasma chauffé, qui nous sert de témoin. La transformation dûe au chauffage *in vitro* est ainsi annulée.

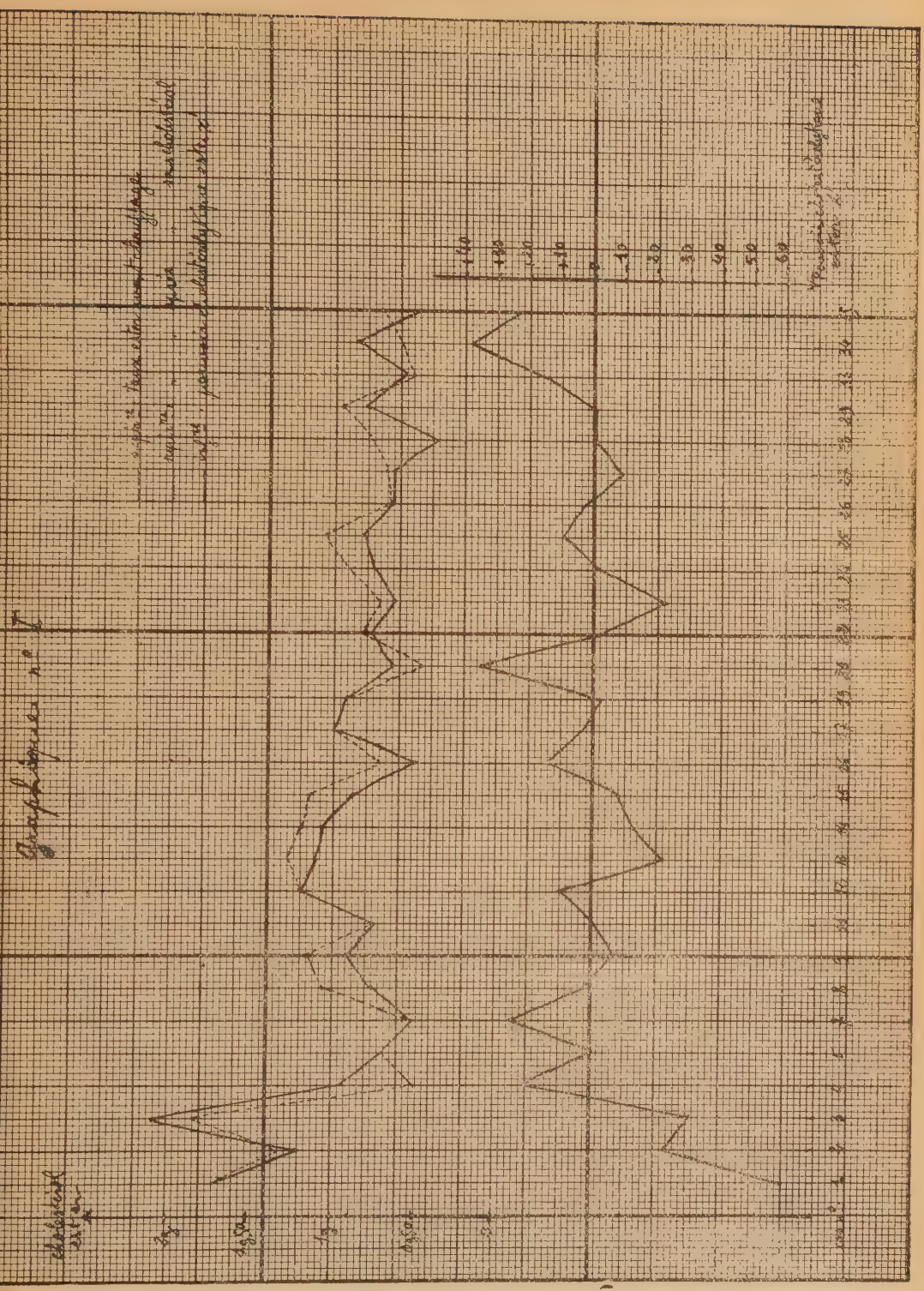
5° Dans le sérum, nous avons calculé la sérine, et le rapport sérine/globuline, dit S/G. En regard des diverses quantités trouvées pour les rapports ci-dessus, nous avons inscrit l'erreur relative pour cent commise sur chaque calcul. (Voir tableau II).

Enfin, au bas des tableaux I et II, on trouvera l'indication brève et caractéristique de chacun des cas pathologiques étudiés. Ces cas, comme nous l'avions déjà dit, sont des plus divers, appartenant à des maladies très différentes.

Pour comparer plus facilement entre eux, ces divers résultats, nous avons tracé un certain nombre de graphiques à deux ou trois courbes. Nous nous excusons d'une énumération un peu fastidieuse ; voici les divers graphiques que nous avions construit :

1° Cholestérol total, avant chauffage, et après chauffage sans cholestérol et pouvoir cholestérolytique total x ;

GRAPHIQUE I

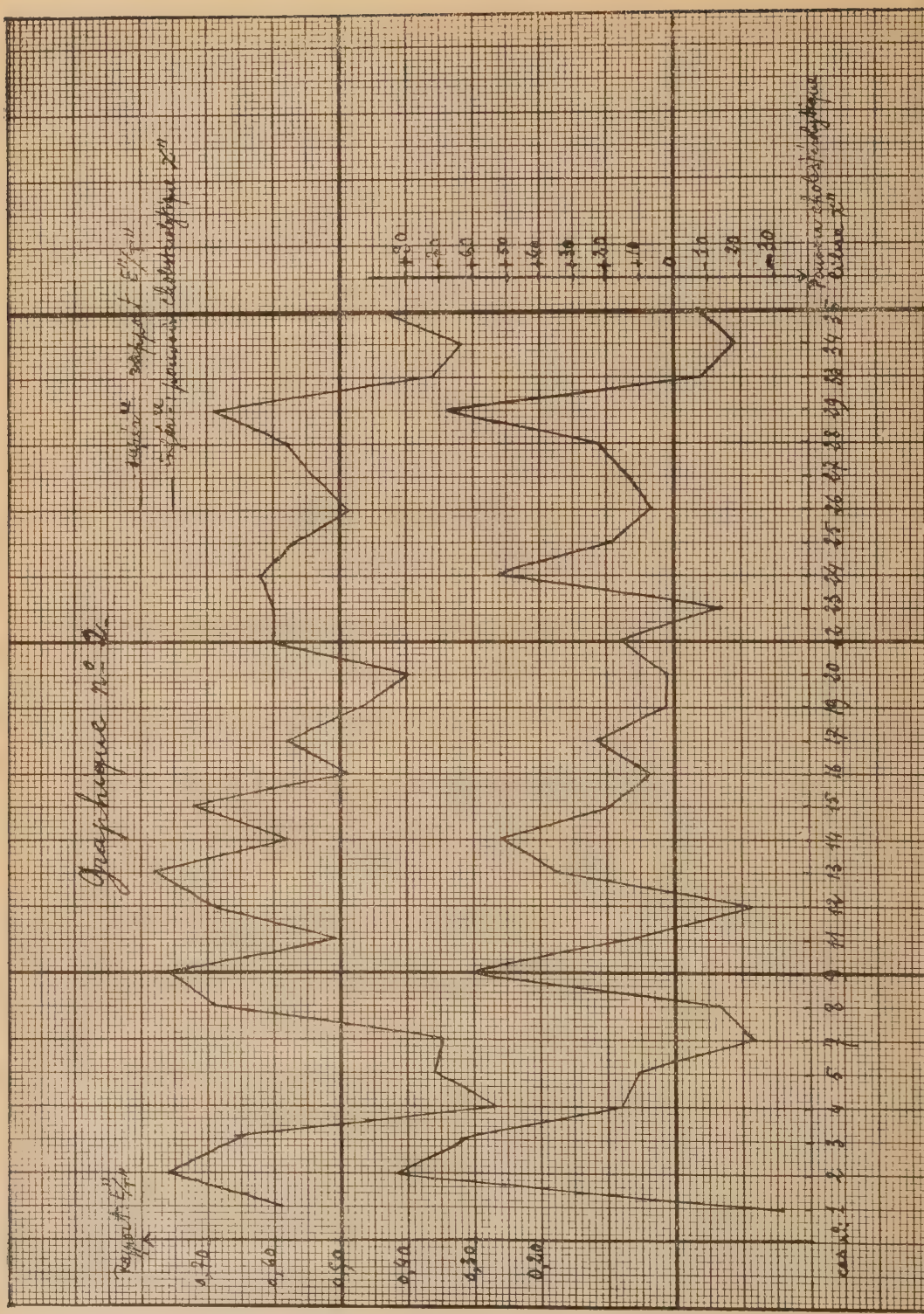


—— Courbe supérieure : taux d'ester avant chauffage.

.... Courbe pointillée : taux d'ester après chauffage sans cholestérol.

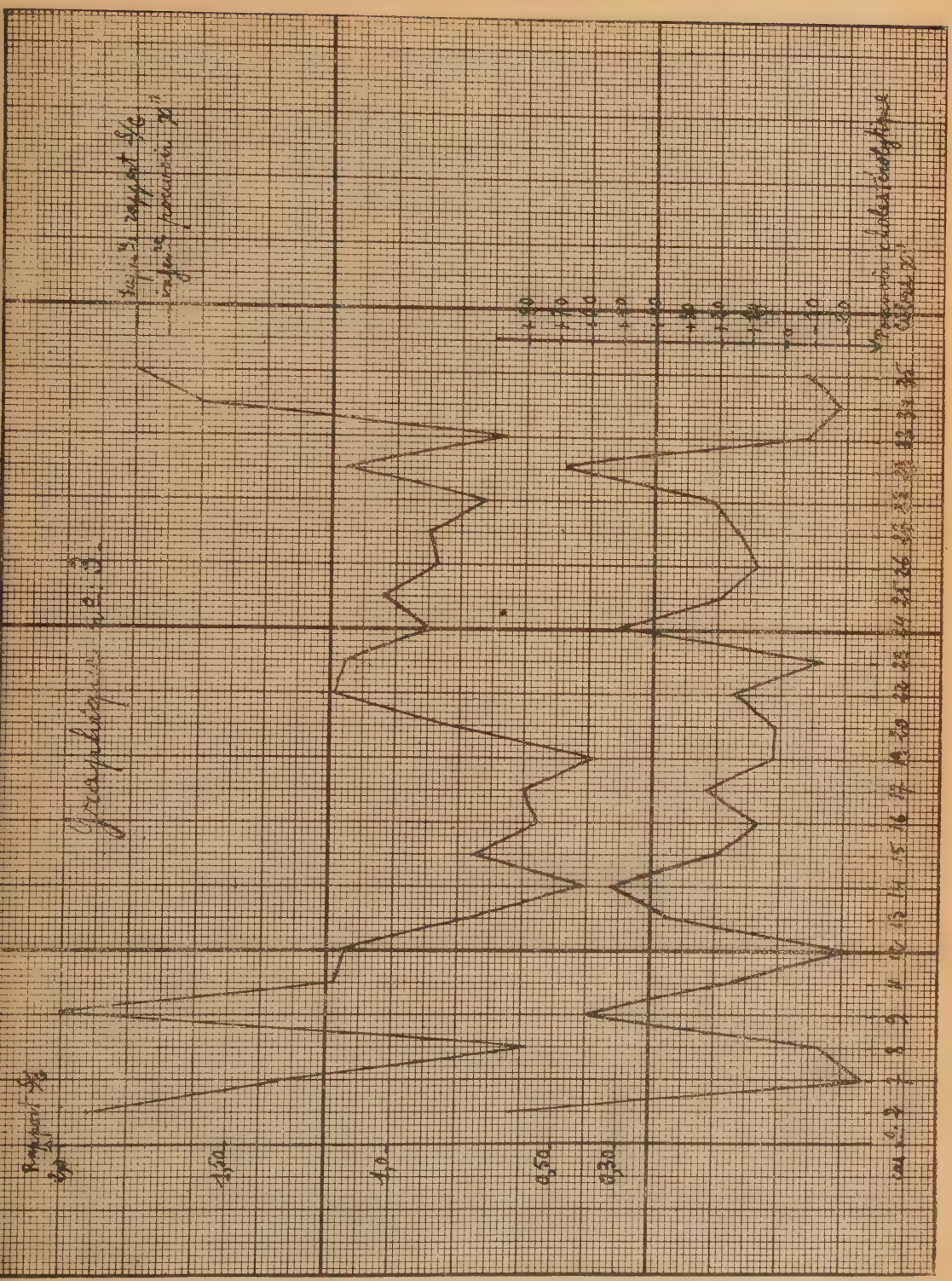
—— Courbe inférieure : pouvoir cholestérolytique ester x'.

GRAPHIQUE II



—— Courbe supérieure : rapport E"/T".
—— Courbe inférieure : pouvoir cholestérolytique libre X".

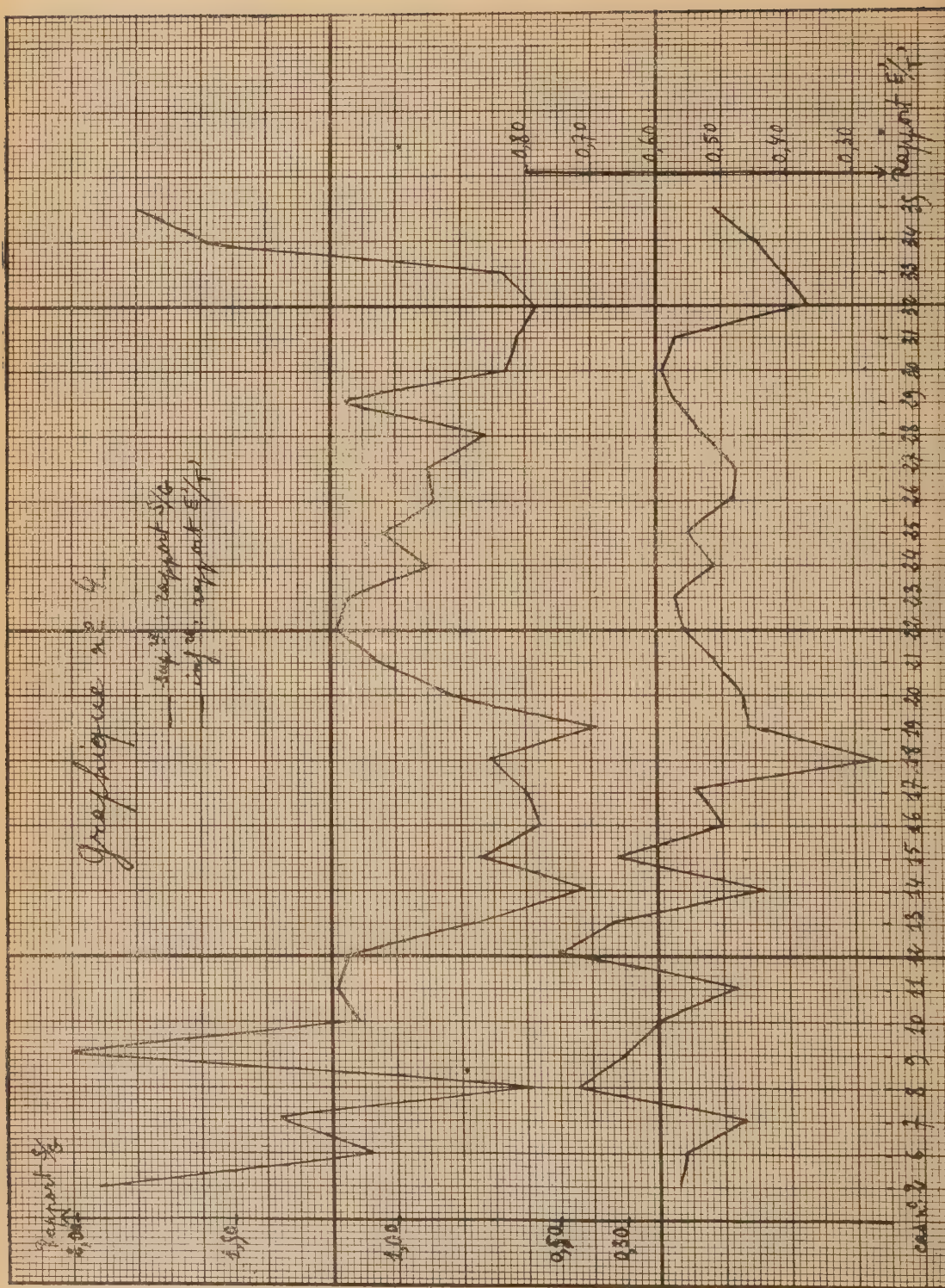
GRAPHIQUE III



—— Courbe supérieure : rapport S/G.

—— Courbe inférieure . pouvoir cholestérolytique libre X".

GRAPHIQUE IV



— Courbe supérieure : rapport S/G.
- Courbe inférieure : rapport E'/T'.

2° Cholestérol ester, avant chauffage et après chauffage sans cholestérol et pouvoir cholestérolytique ester x' ;

3° Pouvoirs cholestérolytique total x, ester x', libre x'' ;

4° Pouvoir cholestérolytique total x et rapport E/T. Ceci est logique, car le cholestérol total ne change pas pendant le chauffage sans cholestérol, comme nous le verrons ;

5° Pouvoir cholestérolytique total x, taux de protéides totales et rapport S/G.;

6° Pouvoir cholestérolytique ester x' et rapport E''/T'' ; ceci est également normal, le cholestérol ester changeant de taux par simple chauffage sans cholestérol ;

7° Pouvoir cholestérolytique entre x' et taux de protéides totales, ainsi que rapport S/G.;

8° Pouvoir cholestérolytique libre x'' et rapport E''/T'' ; ceci est également logique, le cholestérol libre changeant de taux par simple chauffage sans cholestérol ;

9° Pouvoir cholestérolytique libre x'', et taux de protéides totales et rapport S/G ;

10° Rapport S/G et rapport E'/T'.

De tous ces graphiques, nous n'en publions que quatre ; ce sont ceux qui nous donnent les principales conclusions. Ces graphiques sont le 2, le 8, le 9 (sans les protéides totales) et le 10. Ces graphiques sont les graphiques I, II, III, IV, ci-joints.

Le graphique n° 1 comporte trois courbes. Les deux courbes supérieures représentent le taux de cholestérol ester avant chauffage et après chauffage sans cholestérol; la ligne pleine représente le cholestérol ester avant chauffage ; la ligne pointillée, que recouvre parfois la précédente, le cholestérol ester après chauffage sans cholestérol. La courbe inférieure traduit les variations du pouvoir cholestérolytique

x' (ester), calculé en prenant pour chiffre initial de cholestérol ester, celui du plasma chauffé sans cholestérol.

Le graphique n° 2 traduit, par sa courbe supérieure, les variations du rapport E''/T'', entre cholestérol ester et cholestérol total, dans le plasma chauffé sans cholestérol. La courbe inférieure représente le pouvoir cholestérolytique libre x'', calculé en prenant comme chiffre initial de cholestérol libre, celui du plasma chauffé sans cholestérol.

Le graphique n° 3 représente dans sa courbe supérieure, les variations du rapport sérine/globuline ou S/G, dans le sérum non chauffé. La courbe inférieure est celle des variations concommittantes du pouvoir cholestérolytique libre x''.

Le graphique n° 4 traduit, dans sa courbe supérieure, les variations du rapport S/G. La courbe inférieure représente les variations du rapport E'/T' (cholestérol ester / cholestérol total), dans le plasma après chauffage en présence de cholestérol.

Nous allons voir maintenant les conlusions que nous avons tirées des résultats que nous venons d'examiner.

CHAPITRE VIII

CONCLUSIONS

Nous nous étions proposé d'étudier le mécanisme du pouvoir cholestérolytique et d'examiner l'influence des substances protéidiques sur les variations de cette propriété du sang.

Dans le chapitre IV, nous avons mis en évidence certaines questions auxquelles nous avons essayé d'apporter quelques solutions par des expériences personnelles.

L'examen de nos résultats nous permet de faire les constatations suivantes que nous exposons dans ce dernier chapitre de notre travail :

1° Le cholestérol total ne varie pas au cours du chauffage du plasma à 37°, les chiffres différents obtenus dans quelques cas étant trop voisins pour penser qu'il y ait eu variation du taux de cholestérol total, ceci semblant d'ailleurs évident *à priori*.

Le taux de cholestérol estérifié subit par contre des variations quelquefois assez sensibles ; la comparaison des résultats inscrits au tableau II montre que le rapport E''/T'' (cholestérol ester / cholestérol total), relatif au plasma chauffé sans cholestérol, est supérieur au rapport E/T (cholestérol ester / cholestérol total) relatif au plasma non chauffé dans 17 cas ; il reste stationnaire dans 7 cas, et est inférieur dans 4 cas ; étant donné la fixité du taux de cholestérol total, nous constatons donc que, par suite du chauffage à 37°, il se produit une modification de la forme du cholestérol dans un sens tel qu'il y a, dans la plupart des

cas observés, augmentation du taux de cholestérol estérifié. Le maintien du plasma à 37° semble donc avoir pour résultat de modifier la répartition du cholestérol dans celui-ci, cette modification se traduisant, le plus souvent, par une augmentation des esters du cholestérol aux dépens du cholestérol libre.

2° Etant donnée la variation du rapport E/T (cholestérol ester / cholestérol total) pendant le chauffage, il est intéressant de voir dans quel sens varie le même rapport E'/T' dans le plasma chauffé à 37° en présence de cholestérol

La comparaison du rapport E'/T', relatif au plasma chauffé en présence de cholestérol, avec le rapport E''/T'', relatif au plasma chauffé sans cholestérol, dans les mêmes conditions, montre que ce quotient subit des variations sensibles. On le trouve augmenté dans 6 cas, stationnaire dans 4 cas, et inférieur dans 18 cas. On constate donc, d'une façon générale, au cours de la mesure du pouvoir cholestérolytique, qu'il y a augmentation du cholestérol libre, cette augmentation provenant soit d'un apport de cholestérol par dissolution, soit aux dépens du cholestérol estérifié déjà existant.

3° Le pouvoir cholestérolytique x et ce que nous avons appelé le pouvoir cholestérolytique du cholestérol ester x' (qui traduit plus exactement les variations de taux de la forme estérifié du cholestérol dans le plasma en présence de cholestérol), ont-ils une relation avec le taux de cholestérol total ou estérifié ?

Les résultats des tableaux I et II montrent que le pouvoir cholestérolytique n'a aucune relation avec le taux de cholestérol total. Par contre, le pouvoir cholestérolytique x' de l'ester semble être d'autant plus bas que le taux d'ester après chauffage sans cholestérol est plus élevé (voir graphique n° 1) ; il semble donc varier en raison inverse du taux d'ester (sauf cas n° 12) ; autrement dit, le chauffage du plasma avec du cholestérol tend à diminuer la propor-

tion d'ester, si la quantité existante est élevée, et à l'augmenter si elle est faible.

4° Les variations du cholestérol total, du cholestérol estérifié et du cholestérol libre, ou, autrement dit, le pouvoir cholestérolytique total x, et ce que nous avons appelé les pouvoirs cholestérolytiques de la forme ester x' et du cholestérol libre x'' ont-ils la même valeur ?

Nous constatons que ceci est assez rare et ne se produit que pour les cas 4, 16, 19, 23, 25, 26 ; soit 6 cas sur 28, et, encore ces cas présentent-ils des écarts assez grands. En aucun cas, sauf le n° 19, on ne trouve des chiffres très voisins. Il faut noter, par contre, que les variations de x' sont d'amplitude relativement faibles, alors que celles de x'' sont très grandes ; d'autre part, les variations de x sont, dans la plupart des cas observés, de même sens que celles de x''. Il semble donc que c'est la variation du cholestérol libre, qui joue le principal rôle dans l'évaluation du pouvoir cholestérolytique total x.

5° La solubilisation du cholestérol total (pouvoir x) est-elle fonction du rapport E''/T'' ?

Aucune relation évidente ne paraît exister entre le rapport E''/T'' et x (voit tableau II) ; nous prenons comme point de comparaison le rapport E''/T'', évalué sur le plasma chauffé dans les mêmes conditions, sans cholestérol.

6° Cette même solubilisation du cholestérol total est-elle fonction du rapport S/G ou du taux des protéides totales ?

Les tableaux I et II montrent qu'il ne semble pas y avoir de relation dans ce sens.

7° La solubilisation ou la variation de cholestérol ester (pouvoir x') est-elle fonction du rapport E''/T'' ?

Le tableau II montre qu'il n'y a de même dans ce cas aucune relation.

8° Ce même pouvoir x' dépend-til du taux de protéides totales ou du rapport S/G ?

Les tableaux I et II ne mettent aucune relation en évidence.

9° La solubilisation ou plutôt la variation du cholestérol libre (pouvoir cholestérolytique x'') est-elle fonction du rapport E''/T'' ?

Le graphique n° 2 montre la relation très nette qui existe entre ces deux rapports. Elle est particulièrement évidente entre les cas 1 à 11 et 15 à 35. Il semble par conséquent qu'il se dissout d'autant plus de cholestérol libre qu'il existe déjà une plus grande proportion d'ester dans le plasma.

10° Cette même solubilisation ou cette variation du cholestérol libre dépend-elle du taux des protéides totales, de la sérine, de la globuline, et du rapport S/G ?

Les tableaux I et II montrent qu'aucune relation n'existe entre le pouvoir x'' et les taux de protéides, de sérine et de globuline. Le graphique n° 3 montre par contre les relations qui existent entre le rapport S/G et le pouvoir x'' ; ces relations sont particulièrement nettes, entre les cas 2 à 9, 15 à 23 et 25 à 33. Par conséquent, il semble que le plasma soit capable de dissoudre d'autant plus de cholestérol libre que la quantité de sérine par rapport à la globuline est plus grande.

Le graphique n° 4 montre d'autre part que dans la répartition finale du cholestérol, au cours du maintien du plasma à 37° en présence de cholestérol, les rapports S/G et E'/T' varient dans le même sens ; ceci est particulièrement net pour les cas de 12 à 17, de 20 à 27, et de 32 à 35. Il semble se fixer dans le plasma, d'autant plus de cholestérol sous forme d'ester que le rapport : sérine / globuline est plus grand.

En résumé, nous apportons les conclusions suivantes : Nous avons recherché le mécanisme du pouvoir cholestérolytique ; nous avons vu que le chauffage du plasma à

37° modifie dans certains cas le mode de répartition du cholestérol dans celui-ci. D'autre part, dans la mesure du pouvoir cholestérolytique, il y a encore modification de cette répartition ; on peut supposer ou que du cholestérol libre se dissout, ou que des esters sont hydrolysés avec apparition de cholestérol libre ; dans notre étude, nous avons constaté que ces divers cas peuvent se produire. D'autre part, les esters ont d'autant plus de tendance à s'hydrolyser au cours de la mesure du pouvoir cholestérolytique que leur taux est plus élevé, ainsi que le montre le graphique n° 1.

Il en résulte ceci, par exemple dans le cas n° 15, le pouvoir cholestérolytique total est nul, mais le pouvoir x' est de —7,8 et le pouvoir x'' de +20 ; le taux du cholestérol total dans ce cas n'a pas varié, mais toutefois des modifications profondes ont apparu, que ne laissait pas prévoir la détermination unique du pouvoir cholestérolytique total x ; il y a eu disparition d'une fraction d'ester avec apparition corrélative d'une quantité correspondante de cholestérol libre.

Nous voyons ainsi que la détermination des variations des deux formes sous lesquelles peut se présenter le cholestérol, c'est-à-dire à l'état libre et à l'état d'ester, et que nous avons envisagées sous les dénominations de pouvoir cholestérolytique de l'ester x' et du pouvoir cholestérolytique du cholestérol libre x'', nous permet de constater des modifications importantes de ces deux formes au cours du chauffage du plasma en présence de cholestérol ; les variations du cholestérol libre, qui se manifestent au cours de la mesure du pouvoir cholestérolytique total semblent, en général, plus sensibles que les variations corrélatives du taux de cholestérol total, et nous conduisent à penser que cette détermination de ce pouvoir cholestérolytique du cholestérol libre est susceptible d'apporter un complément intéressant dans l'étude du pouvoir cholestérolytique total.

Nous constatons d'autre part que la variation du taux

du cholestérol libre est liée au taux du cholestérol estérifié présent dans le plasma ; il y a une augmentation d'autant plus importante qu'il existe plus de cholestérol sous la forme d'esters (graphique n° 2). La solubilisation du cholestérol semble aussi en relations avec le taux de la sérine et surtout avec le rapport sérine / globuline (graphique n° 3). Enfin, la répartition du cholestérol, dans le plasma, semble dépendre aussi du rapport sérine / globuline (graphique n° 4) ; les variations de celle-ci s'effectuant dans le même sens que le rapport de ces deux substances protéidiques.

Vu,

Strasbourg, le 8 *juin* 1937,

Le Président du Jury,

A. Sartory.

Vu et approuvé,

Strasbourg, le 8 *juin* 1937,

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

A. Sartory.

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 10 *juin* 1937,

Le Recteur de l'Académie, Président du Conseil de l'Université

J. Dresch.

BIBLIOGRAPHIE

ABRÉVIATIONS

J. P. C. : Journal de pharmacie et de chimie.
C. R. S. B. : Compte rendu de la Société de biologie.
C. R. Ac. Sc. : Compte rendu de l'Académie des sciences.
B. S. C. B. : Bulletin de la Société de chimie biologique.

1. — Abrami et Robert Wallich : Modifications du sérum et inversion du rapport sérine-globuline dans les cirrhoses du foie, *C. R. S. B.*, 1929, 101, 291.

1 *a*. — Abelous et Soula : Fonction cholestérinogène de la rate, *C. R. Ac. Sc.*, 1924, 178, 1850; 1926, 180, 98 ; *Soc. de Biol.*, 1920, 183, 445.

2. — Abramsohn-Doris : Application de la réaction de Salkowsky au dosage du cholestérol, *Biochem. Zeits.*, 1928, 198, 233.

3. — Achard et Arcand : Sur le rapport des protéides et des lipides dans le sérum, *C. R. S. B.*, 1929, 102, 986.

4. — Achard, Grigaut et Coudounis : Dosage réfractométrique des protéides, *C. R. S. B.*, 1930, 103, 679.

5. — Adler, Lemmal et Epstein : Diminution des esters du cholestérol dans les lésions hépatiques, *Arch. of intern. med.*, 1931, 47, 1.

5 *a*. — Aper, Pechery et Rouillard : Sucre et cholestérol, *Soc. de Biol.*, 25 mai 1912.

5 *b*. — Agasse-Lafont : *Précis de biologie clinique*, 1932.

6. — Arcand : *Recherches sur le dosage des protéides*, Th. Doct. Paris, 1930.

7. — Arcand : Dosages des protéides par la méthode de Piettre et Vila, *J. P. C.*, 1931, 1, 518.

7 *a*. — Aschoff : Le métabolisme du cholestérol et les maladies vasculaires, *Presse méd.*, n° 28, 8 avril 1933.

8. — Aujaleu, Bugnard, Colombiès et Guilhem : Sur la cholestérolémie au cours de la grossesse, *C. R. S. B.*, 1934, 115, 1461.

9. — Avellar de Loureiro : Dosage néphélométrique des protéides, *C. R. S. B.*, 1930, 104, 919 et 921.

9 *a*. — Barral : *Analyse biologique clinique-sang*, Baillère, 1931.
10. — Bierry et Moquet : Dosage des protéides totales, *C. R. S. B.*, 1922, 87, 329.
11. — Blanc : *Le cholestérol*, Th. méd., Marseille, 1931.
11 *a*. — Biscous et Rouzaud : Sucre et cholestérol, *Revue méd.*, 1922.
12. — Bloor : Lipémie, *Journ. of biol. Chim.*, novembre 1911, 201.
13. — Bloor : Dosage de la lécithine, *Journ. of biol. Chim.*, 1915, 22, 133.
14 *a*. — Bloor : Méthode de dosage du cholestérol et de ses esters, *Journ. of biol. Chim.*, 1916, 24, 227 et 27, 107.
14 *b*. — Boulanger : Méthode permanganimétrique de dosage des protéides, *C. R. S. B.*, 1929, 101, 837.
15. — Boulanger et Warembourg : Dosage des protéides par oxydation, *C. R. S. B.*, 1931, 106, 958.
16. — Boutroux : Dosage des protéides par oxydation sulfochromique, *Bull. S. Ch. B.*, 1932, 14.
17 *a*. — Bruger et Somach : Les variations diurnes de la teneur en cholestérol du sang, *Journ. of biol. Chim.*, 1932, 97, 23.
17 *b*. — Bugnard : *La cholestérolémie*, Th. pharm. Toulouse, 1929.
18. — Bugnard : Coagulation du sang et teneur du sérum en cholestérol, *C. R. S. B.*, 1929, 102, 291.
19. — Bugnard, Colombiès et Guilhem : La cholestérolémie dans la grossesse, *Gynéc. et obstétr.*, 1936, 33, 346.
20. — Cahn et Houguet : Le transport des lipides dans l'organisme, *C. R. Ac. Sc.*, 1935, 302, 166.
21. Caminade : Sur quelques modifications apportées au dosage du cholestérol, *B. S. C. B.*, 1922, 4.
22. — Castex et Schteingart : Relations entre le glucose, l'azote et le cholestérol, *C. R. S. B.*, 1933, 114, 745.
23. — Chabrol, Cottet et Salet : Variations du cholestérol et du sucre sanguin, *C. R. S. B.*, 1936, 122, 905.
24. Charonnat : Solubilité du cholestérol dans le sérum, *J. P. C.* 1935, 2, 574.
25. — Charonnat : Influence des sels sur la libération du cholestérol, *J. P. C.*, 1936, 1, 105.
26. — Charonnat : Les substances libérant le cholestérol du support protéidique, *J. P. C.*, 1936, 1, 307.
27. — Chauffard, Laroche et Grigaut : Rapport entre cholestérolémie et urémie, *C. R. S. B.*, 1911, 70, 108.
28. — Chauffard, Laroche et Grigaut : La cholestérolémie dans les affections aiguës, *Sem. méd.*, 6 décembre 1911.
29. — Chauffard, Brodin et Grigaut : Métabolisme des lipides, *Presse méd.*, 15 décembre 1920, 905.
30. Chiray et Demanche : Dosage réfractométrique des protéides, *C. R. S. B.*, 1907, 63, 235.
31. — Claude, Targowla et Badonnel : Le cholestérol dans les psychopathies, *C. R. S. B.*, 1926, 94, 102.

32. — Coquelet et Bigwood : Microdosage colorimétrique du cholestérol, *C. R. S. B.*, 1927, 97, 749.
33. — Cruto : Métabolisme des lipides, *Biochem. e ter. sper.*, 1929, 16.
34. — Cuny : La constitution moléculaire du cholestérol, *J. P. C.*, 1928, 2, 18.
35. — Dam : Remarques sur le dosage du cholestérol, *Biochem. Zeits.*, 1928, 194, 177.
36. — Decourt et Lœper : Floculoréaction du cholestérol colloïdal, *C. R. S. B.*, 1928, 98, 19.
37. — Decourt et Lœper : Floculoréaction du cholestérol, *C. R. S. B.* 1928, 98, 94.
38. — Defaye : *La cholestérolémie*, Th. méd. Bordeaux, 1911.
39. — Demenier : *Dosage du rapport sérine-globuline*, Th. pharm. Bordeaux, 1934.
39 *a*. — Denigès : *Précis de chimie analytique*, 1930.
39 *b*. — Derrien et Fontès : *Chimie biologique*, 1931.
40. — Dorle et Weiss : Sur le rapport entre l'activité lipolytique et la teneur en cholestérol du sérum, *Biochem. Zeits.*, 1926, 167, 394.
41. — Eck et Desbordes : Sur la cholestérolémie et le pouvoir cholestérolytique du vieillard, *C. R. S. B.*, 1934, 117, 428.
42. — Eck et Desbordes : Intérêt de la mesure du pouvoir cho'estérolytique, *C. R. S. B.*, 1934, 117, 429.
43. — Eck et Desbordes : Sur les rapports entre le pouvoir cholestérolytique et la teneur en protéides, *C. R. S. B.*, 1934, 117,615.
44. — Eck et Desbordes : Influence de la stimulation hépatique sur l'hypercholestérolémie, *C. R. S. B.*, 1934, 117, 681.
45. — Eck et Desbordes : Influence de l'âge sur la cholestérolémie et le pouvoir cholestérolytique, *C. R. S. B.*, 1935, 118, 498.
46. — Eck et Tixier : Traitement de l'hypercholestéro'émie, *Soc. Thérapeut.*, 18 octobre 1934.
47. — Edgard-Rosa : Le pouvoir cholestérolytique, *Bull. Biol. Pharm.*, 1935, 142.
48. — Fex : *Dosage du cholestérol et de ses esters*, Th. méd., Lund, 1920.
49. — Fishberg (E.-H.) : Protéidémie et lipémie, *Journ. of biol. Chim.*, 1929, 81, 205.
50. — Gardner et Gainsborough : La teneur en cholestérol du plasma, *Biochem. Journ.*, 1927, 21, 130.
51. — Gardner et Gainsborough : L'affinité des protéides du plasma pour les stérols, *Biochem. Journ.*, 1927, 21, 141.
52. — Gardner et Gainsborough : Sur l'hypercholestérolémie alimentaire, *Biochem. Journ.*, 1928, 22, 1048.
53. — Gavrila et Beriaru : La cholestérolémie dans les néphrites chroniques, *C. R. S. B.*, 1928, 98, 415.
54. — Gavrila et Beriaru : La cholestérolémie dans les maladies infectieuses, *C. R. S. B.*, 1928, 99, 1814.
55. — Gavrila et Hanganutz : La cholestérolémie chez les syphilitiques, *C. R. S. B.*, 1928, 98, 721.

56. — Gavrila et Vior : La cholestérolémie chez les tuberculeux, *C. R. S. B.*, 1927, 97, 769.
57. — Gérard : Solubilité du cholestérol dans les sels biliaires, *J. P. C.*, 1905, 21, 345.
58. — Gœbel : Rapport entre glycémie et cholestérolémie, *C. R. S. B.*, 1932, 109, 259.
59. — Goffinet et Reding : Dosage du cholestérol libre par la digitonine, *C. R. S. B.*, 1935, 118, 1481.
60. — Goffinet et Reding : Dosage du cholestérol total, *C. R. S. B.*, 1935, 119, 330.
61. — Gordonoff et Zurukzoglu : La cholestérolémie dans la vieillesse, *Schweiz. Mediz. Wochenschr.*, 1934, 64, 18.
62. — Grigaut : *Cycle de la cholestérolémie*, Th. méd., Paris, 1913.
63. — Grigaut : Dosage colorimétrique de la lécithine, *C. R. S. B.*, 1924, 91, 1014.
64. — Grigaut : Dosage du cholestérol libre, *C. R. S. B.*, 1933, 112, 34.
65. — Grigaut : Dissociation du complexe lipidoprotéidique par l'alcool, *B. S. C. B.*, 1935, 17, 1031.
66. — Grigaut, Boutroux et Coudounis : Dosage des protéides par précipitation alcoolique, *B. S. C. B.*, 1929, 11.
67. — Grigaut et Laroche : Modifications de la cholestérolémie chez les oxalémiques, *C. R. S. B.*, 1928, 98, 1104.
68. — Grigaut et Laroche : Le cholestérol et ses dérivés dans l'organisme, *Soc. Thérapeut.*, 18 novembre 1934.
69. — Grigaut et Laroche : Le taux de cholestérol des hématies, *C. R. S. B.*, 1936, 122, 1253.
70. — Grigaut et Yowanovitch : L'équilibre lipidique du sérum sanguin, *C. R. S. B.*, 1924, 91, 1310.
71. — Grimbert et Laudat : Dosage des lipides dans le sérum, *J. P. C.*, 1914, 1, 97.
72. — Groupaud : *La lipémie et la cholestérolémie*, Th. pharm., Bordeaux, 1934.
73. — Gruzewska et Roussel : Variations de la cholestérolémie par saignées successives, *C. R. S. B.*, 1931, 106, 1195.
74. — Gruzewska : Dosage colorimétrique du cholestérol, *C. R. S. B.*, 1931, 108, 934.
74 *a*. — Guiart et Grimbert : *Précis de diagnostic*, 1922.
75. — Howe : Dosage des protéides, *Journ. of biol. Chim.*, 1921, 49, 93.
75 *a*. — Hugounenq : *Chimie physiologique et pathologique*, 1921.
76. — Jullien et Martin-Rosset : Le cholestérol du sérum chez les tuberculeux, *C. R. S. B.*, 1925, 92, 1028.
77. — Kanner : Dosage du cholestérol libre, *C. R. S. B.*, 1931, 108, 383.
78. — Kanner et Chancogne : Comparaison des dosages de cholestérol libre, *C. R. S. B.*, 1933, 113, 57.
79 *a*. — Kayser : Dosage des protéides, *B. S. C. B.*, 1930, 12, 533.

79 *b*. — Khalyl : La solubilité du cholestérol libre dans l'éther de pétrole, *Ann. fac. fr. méd. ph.*, Beyrouth, 1932, 365.
79 *c*. — Khalyl : *Le cholestérol du sang*, Th. pharm., Beyrouth, 1932.
80. — Kumagawa : Dosage des lipides, *Biochem. Zeitsch.*, 1908, 8, 212
81. — Labbé (M.), Labbé (H.) et Nepveux : *Technique de laboratoire*, Masson, 1932.
82. — Labbé (M.) et Heitz : La cholestérolémie dans l'artérite oblitérante, *C. R. S. B.*, 1922, 97, 1024.
82 *a*. — Laudat : *Et. des lipoïdes*, Th. pharm., Paris, 1911.
83. — Laurent-Gérard : Dosage colorimétrique du cholestérol, *C. R. S. B.*, 1928, 98, 1325.
84. — Lemeland : Dosage du phosphore lipidique total, *C. R. S. B.*, 1921, 84, 446.
85. — Lemeland : Recherches sur les lipides du sang, *B. S. C. B.*, 1921, 3, 162.
86. — Lemeland : Recherches sur le dosage des lipides, *B. S. C. B.*, 1922, 4.
87. — Lemeland : Dosage du cholestérol, *B. S. C. B.*, 1922, 5, 110.
88. — Leuret et Dutrenit : *Le cholestérol*, Baillère, 1934.
89. — Leuret, Caussimon et Vitte : La cholestérolémie chez les tuberculeux, *C. R. S. B.*, 1928, 99, 1984.
90. — Lévy : Traitement de l'hypercholestérolémie, *Bull. Acad. méd.*, 21 avril 1931.
90 *a*. — Lévy (M.) et Lévy (E.) : Traitement de l'hypercholestérolémie par la thyroxine, *Presse méd.*, n° 13, 13 février 1932.
91. — Lœper, Lemaire et Lesure : Le pouvoir cholestérolytique, *C. R. S. B.*, 1928, 98, 101.
91 *a*. — Lœper et Lemaire : Evolution de la dermoréaction au cholestérol, *C. R. S. B.*, 1928, 98, 98.
92. — Lœper, Debray et Tonnet : Le rapport lipocholestérolique des sérums cancéreux, *C. R. S. B.*, 1921, 85, 423.
93. — Lœper, Lemaire et Tonnet : La résorption du cholestérol dans les tissus, *C. R. S. B.*, 1928, 98, 100.
94. — Loiseleur et Mlle Morel : La répartition du cholestérol dans les sérums, *C. R. S. B.*, 1927, 97, 1271.
95. — Lumière et Grange : Action protectrice du cholestérol, *C. R. Acad. Sc.*, 1930, 191, 423.
95 *a*. — Luttringhaus : Stérine, *Hd. der Bioch.*, Iéna, 1933.
96. — Machebœuf : Recherche sur les phosphoaminolipides et stérides, *B. S. C. B.*, 1929, 11, 3.
97. — Machebœuf : Dosage des protéides, *B. S. C. B.*, 1931, 13, 486.
98. — Machebœuf et Sandor : La solidité des liaisons protéolipidiques, *B. S. C. B.*, 1932, 14, 6.
99. — Machebœuf et Wahl : Les lipides et la néphrose lipoïdique, *B. S. C. B.*, 1931, 13, 736.
100. — Mauriac, Serventie et Demenier : Variations de la sérine-globuline et de l'hypercholestérolémie, *C. R. S. B.*, 1934, 115, 177.

100 *a*. — Mayer et Schaffer : La constante lipémique, *Ac. Sciences*, 1912, 156, 487.
101. — Merklen, Le Breton et Adnot : Dosage de la sérine et de la globuline, *C. R. S. B.*, 1931, 107, 758.
102. — Michail et Vancéa : Recherches sur le pouvoir cholestérolytique, *C. R. S. B.*, 1928, 98, 1470.
103. — Minovici : Origine du cholestérol dans l'organisme, *B. S. C. B.*, 1935, 17, 369.
104. — Moore et Parker : La solubilité du cholestérol dans les sels biliaires, *Proc. of Roy. Soc.*, 1901, 68, 64.
105. — Morais-Sarmento (de) et Bruno da Costa : Le rapport entre le cholestérol et ses esters dans les affections hépatiques, *C. R. S. B.*, 1934, 115, 449.
106. — Munoz : Dosage des phospholipides et du cholestérol, *C. R. S B* 1931, 109, 919.
107. — Munoz : Variations horaires et journalières du cholestérol, *C. R. S. B.*, 1933, 113, 463.
108. — Nekludow et Chalatow : Etude comparative sur la valeur des méthodes de dosage du cholestérol, *Biochem. Zeits.*, 1929, 208, 60.
109. — Nikolaieff et Krasteleoskaya : Sur le mécanisme de la réaction de Salkowsky, *J. Roussk. Fig. Obchtch.*, 1928, 60, 1211.
110. — Okey : Microdosage du cholestérol par oxydation de digitonide, *Journ. biol. Chim.*, 1930, 88, 367.
111. — Ornstein : La cholestérolémie chez les aliénés, *C. R. S. B.*, 1925, 93, 1203.
112. — Ornstein : La cholestérolémie chez les aliénés, *C. R. S. B.*, 1926, 95, 793.
113. — Ornstein, Sibi et Branover : Influence des substances vagotropes et sympathicotropes sur la cholestérolémie, *C. R. S. B.* 1934, 115, 779.
114. — Pahron et M. Pahron : L'hypercholestérolémie de la vieillesse, *C. R. S. B.*, 1923, 88, 231.
115. — Pahron et Ornstein : Influence de la thyroxine sur la cholestérolémie, *C. R. S. B.*, 1931, 108, 303.
116. — Pahron et Ornstein : Teneur en lipides et protéides du sérum, *B. S. C. B.*, 1935, 17, 1119.
117. — Pahron, Ornstein et Sibi : Variation des rapports entre certains constituants chimiques du sang, *C. R. S. B.*, 1934, 116,267.
118. — Piettre : Dosage des protéides, *J. P. C.*, 1926, 1, 97 ; *C. R. Ac. Sc.*, 1923, 178, 333.
119. — Piettre et Vila : Dosage des protéides, *C. R. Ac. Sc.*, 1920, 170, 1466 et 171, 352.
120. — Polonowsky : Microdosage des substances réductrices, indice chromique, *C. R. Soc. Biol.*, 1922, 86, 853.
121. — Polonowsky, Boulanger et Warembourg : Microdétermination des protéides par oxydation sulfochromique, *B.S.C.B.*, 1933, 15.

122. — Polonowsky, Warembourg et Cuvelier : Microdosage des protéides sanguines, *C. R. Soc. Biol.*, 1932, 109, 673.
123. — Porges et Neubauer : Le cholestérol colloïdal, *Biochem. Zeitsch.*, 1908, 7, 152.
124. — Poutchinsky et Glouhenky : Dynamique du taux de cholestérol, *B. S. C. B.*, 1935, 17, 1836.
124 *a*. — Prueck : *Anatomisches Zurfrage*, 1920.
125. — Rabinowitsch : L'hypercholestérolémie et le rapport sérine-globuline, *Arch. intern. méd.*, 1930, 46, 752.
126. — Roche : Microdosage des albumines et globulines, *C. R. S. B.*, 1936, 121, 1022.
127. — Rona et Kleinmann : Dosage néphélométrique des protéides, *Biochem. Zeitsch.*, 1923, 140, 161.
128. — Roger et Binet : La lipodiérèse du sang, *C. R. S. B.*, 1922, 86, 79 et 203.
128 *a*. — Rosenthal : Rapports entre sucre et cholestérol, *Arch. of intern. méd.*, 1932, 684.
128 *b*. — Rosenheim : *Chim. and Industry*, 1932, 464.
129. — Roubeau : *Contribution à l'étude du cholestérol*, Th. pharm., Toulouse, 1930.
130. — Ruszny ack : Dosage néphélométrique des protéides, *Biochem. Zeits.*,1922, 133, 365.
131. — Sannié et Truhaut : Précipitation spontanée du cholestérol dans un plasma, *C. R. S. B.*, 1934, 117, 1188.
132. — Shimidzu : Dosage des lipides, *Biochem. Zeitsch.*, 1910, 237.
132 *a*. — Schmidt : *Bert. Path. Anath.*, 1921, p. 222.
133. — Schonheimer et Breusch : Un nouvel ester du cholestérol, *Zeitsch. physiol. chim.*, 1932, 211, 19.
134. — Sorensen : Dosage de phosphore dans les protéides, *Compt. R. Trav. Lab. Carlsberg*, 1925, XV, 10, 1-6.
135. — Suranyi : Contribution à l'étude du dosage du cholestérol, *Biochem. Zeitsch.*, 1927, 180, 293.
136. — Suranyi et Korényi : Méthode de dosage du cholestérol, *Biochem. Zeitsch.*, 1925, 160, 178.
137. — Szent-Georgyi : Die gravimétrische Mikrocholesterinbestimmùng, *Biochem. Zeitsch.*, 1923, 136, 107.
138. — Szent-Georgyi : Die titrimetrische Mikrocholesterinbestimmüng, *Biochem. Zeitsch.*, 1923, 136, 112.
138 *a*. — Terroine : Sur la teneur des tissus en lipides et en cholestérol, *Journ. psychol. et pathol. générales*, t. XVI, p. 408.
139. — Turner : Méthode simplifiée pour le dosage du cholestérol, *Journ. biol. chim.*, 1931, 92, 495.
140. — Velluz : Les propriétés solubilisantes des savons et des corps non saturés, *C. R. Ac. Sc.*, 1926, 182, 1178 ; *B. S. C. B.*, 1926, 8, 751 ; 1927, 9, 483 et 825 ; 1928, 10, 1227.
141. — Velluz : Sur la détermination du rapport cholestérol ester-cholestérol total, *C. R. S. B.*, 1933, 112, 255.
142. — Velluz : Valeur du rapport cholestérol ester-cholestérol total, *C. R. S. B.*, 1933, 112, 256.

143. — Velluz et Bouchara : Associations solubles du cholestérol et de savons, *C. R. S. B.*, 1931, 106, 1131.
144. — Vernes, Bricq et Basoche : La cholestérolémie, *Arch. Inst. Prophyl.*, 1932, 4, 246.
145. — Villiers : Dosage des lipides phosphorés, *C. R. Ac. Sc.*, 1893, 116, 990.
146. — Vila : Dosage des protéides, *C. R. Ac. Sc.*, 1922, 174, 1131.
147. — Vitte : *La cholestérolémie dans la tuberculose*, Th. méd., Bordeaux, 1928.
148. — Watrin et Winimarter : L'hypercholestérolémie de la grossesse, *C. R. S. B.*, 1921, 85, 265.
149. — Widal, Weil et Laudat : La lipémie des brightiques, *Sem. méd.*, 6 novembre 1912.
149 *a*. — Wieland : Ber. (A), 1934, 67, 27.
150. — Windaus : Uber die quantative Bestimmüng des cholesterin und der cholesterinester, *Zeits. Physiol. Chim.*, 1910, 65, 110.
150 *a*. — Windaus : La formule du cholestérol, *Zeits. Physiol. Chim.*, 1932, 213, 147.
151. — Wu : Dosage des protéides, *Journ. biol. chim.*, 1922, 51, 33.
152. — Wunschendorff : Le dosage indirect des protéides, *J. P. C.*, 1925, 2, 72.
153. — Yasuda : Microdosage du cholestérol, *Journ. biol. chim.* 1931, 92, 303.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 9

PREMIÈRE PARTIE : *Données acquises sur le cholestérol, le pouvoir cholestérolytique et leurs relations avec les autres constituants du sang* 11

I. — Le cholestérol et ses états dans le sang 13

II. — Le pouvoir cholestérolytique 23

III. — Le cholestérol et ses rapports avec les autres constituants du sang 28

DEUXIÈME PARTIE : *Recherches et résultats expérimentaux. — Conclusions tirées de ceux-ci* 35

IV. — But de notre Etude 37

V. — Le dosage du cholestérol et de ses esters . . 41

VI. — Le dosage des protéides 56

VII. — Résultats tirés de notre travail 63

VIII. — Conclusion 71

BIBLIOGRAPHIE 77

BESANÇON. — IMPRIMERIE JACQUES ET DEMONTROND